

Organverteilung und Wirkungen
von Fentanyl und seinen Metaboliten
in der Ratte:
Untersuchungen zur Aufklärung des
„Fentanyl-Rebounds“

von

Ernst Schneider

aus Altötting

Univ. Erlangen
1983

1983 # 467

**Organverteilung und Wirkungen
von Fentanyl und seinen Metaboliten
in der Ratte:
Untersuchungen zur Aufklärung des
„Fentanyl-Rebounds“**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg**

**zur
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von
Ernst Schneider
aus Altötting**

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 1983

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof.Dr.K.Jacobs

Erstberichterstatter: Prof.Dr.C.-G.Arnold

Zweitberichterstatter: Prof.Dr.K.Brune

INHALTSVERZEICHNIS

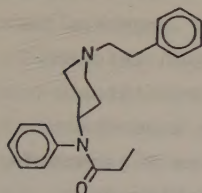
	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	5
2.1 Tierversuche	5
2.2 Ganzkörperautoradiographie	6
2.3 Bestimmung der Gesamtradio- aktivität in Blut und Organen	8
2.4 Radiochromatographische Methoden	9
2.4.1 Prächromatographische Extraktions- verfahren	9
2.4.2 Dünnschichtchromatographische Trennung basischer Fentanyl- metaboliten	10
2.4.3 Dünnschichtchromatographische Trennung saurer Metaboliten und deren Konjugate	11
2.4.4 Derivatisierungsversuche zur weiteren Auftrennung der Fentanyl- fraktion	13
2.4.5 Quantitative Auswertung der Chromatogramme	14
2.5 In vitro-Versuch zur Methylierung von Nor-Fentanyl	15
2.6 Modell des isolierten, koaxial gereizten Meerscheinchennileums zur Bestimmung der Opiatpotenz	16
2.7 Substanzen	20
2.7.1 Laborchemikalien	20
2.7.2 Prüf- und Vergleichssubstanzen	20
2.8 Synthesen von Prüf- und Vergleichssubstanzen	21

	Seite
2.8.1	Allgemeines Syntheseschema 21
2.8.2	Synthese von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl 21
2.8.3	Synthese von möglichen Metaboliten des Fentanyls 27
3. Ergebnisse	35
3.1	Qualitative Organverteilung von Fentanyl und seinen Metaboliten, dargestellt durch Ganzkörperautoradiographien 35
3.1.1	Verteilung nach i. v.-Applikation von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl 35
3.1.2	Verteilung nach intragastraler Gabe von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl 43
3.1.3	Verteilung und i. v.-Applikation von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl 43
3.2	Quantitative Organverteilung 53
3.2.1	Vergleich der Blutspiegelkurven nach intravenöser und intragastraler Verabreichung von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl 53
3.2.2	Radiochromatographische Analysen von Organextrakten 56
3.2.2.1	Identifizierung der basischen Metaboliten 57
3.2.2.2	Identifizierung der sauren Metaboliten und ihrer Konjugate in Niere, Leber und Dünndarm 61
3.2.2.3	Konzentrationsverläufe der Metaboliten nach i. v.-Gabe von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl 66

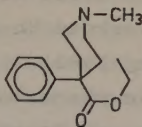
	Seite
3.2.2.4 Metabolitenmuster der Organe 5 Stunden nach intragastraler Fentanyl-Gabe	78
3.2.2.5 Konzentrationsverläufe der Metaboliten nach i. v.-Gabe von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl	81
3.3 Opioatpotenz von Fentanyl und seinen Metaboliten	92
3.4 Versuche zum Nachweis der Methylierung von Nor-Fentanyl in vitro	97
4. Diskussion	99
5. Zusammenfassung	115
6. Literaturverzeichnis	118

1. Einleitung

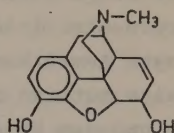
Fentanyl, ein 4-Anilinopiperidin-Derivat, ist von Janssen (1960) bei Arbeiten über Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Morphinabkömmlingen gefunden worden. Es zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit dem 4-Phenylpiperidin-Derivat Pethidin, wie ein Vergleich der Strukturformeln dieser Verbindungen verdeutlicht.



Fentanyl



Pethidin

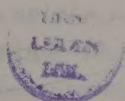


Morphin

Abb. 1.1

Vergleich der Strukturformeln von Fentanyl, Pethidin und Morphin zur Verdeutlichung der gemeinsamen Strukturmerkmale

Die in pharmakologischen Untersuchungen (Gardocky 1964) erkannte außergewöhnlich hohe analgetische Potenz, verbunden mit einem sehr raschen Wirkeintritt und nur kurzer Wirkungsdauer, führten zur Erprobung der Substanz in der chirurgischen Analgesie. Seither wird Fentanyl in großem Umfang in Kombination mit dem Butyrophenon-neuroleptikum Droperidol oder anderen "Tranquillantien" zur sog. Neuroleptanalgesie verwendet. Die Vorteile dieser schonenden Anästhesieform gegenüber einer Narkose mit Injektions- und Inhalationsnarkotika liegen in der großen therapeutischen Breite der eingesetzten Substanzen (unter der Voraussetzung der kontrollierten Beatmung), in der Möglichkeit zur Antagonisierung von Opioidwirkungen sowie in einer wegen der kurzen Halbwertszeit von Fentanyl guten Steuerbarkeit durch Nachinjektion (Rügheimer 1975, Dudziak 1983).



Wie alle Opioide zeigt Fentanyl eine starke atemdepressive Wirkung, die jedoch während der Operation durch den Einsatz von künstlicher Beatmung keine Rolle spielt.

In den letzten Jahren wurde jedoch mehrfach über Fälle von Atemdepressionen berichtet, die einige Zeit (90 min - 2 h) nach normaler Narkoseausleitung und Extubation auftraten (Adams 1978, Becker 1976, Kamp 1982). Diesem Phänomen wurde die Bezeichnung "Fentanyl-Rebound" gegeben. Da aber nicht alle Patienten diese Atemdepression zeigten, wurden eine inadäquate Narkoseführung und operationsbedingte Auswirkungen (Kamp 1982) als Ursache angenommen. Einige Autoren ziehen die pharmakokinetischen Eigenschaften und den Metabolismus von Fentanyl zur Erklärung heran.

Zunächst beschränkten sich pharmakokinetische Analysen auf die Messung von Plasmaspiegeln nach Gabe von radioaktiv markiertem Fentanyl an Versuchstiere und wenige Freiwillige. Dabei erhielt man biphasische Plasmaspiegelkurven mit einem sehr schnellen Abfall in den ersten 10 Minuten (α -Phase oder Verteilungsphase), gefolgt von einem langsameren, der Elimination entsprechenden Absinken der Plasmakonzentrationen (β -Phase). Seit es möglich ist, Fentanyl in geringen Konzentrationen durch Radioimmunoassay (RIA) auch im Plasma einer größeren Zahl von Narkosepatienten zu bestimmen (Henderson 1975, Michiels 1977), wurde immer wieder über einen postnarkotischen, zweiten Anstieg der Plasmaspiegelkurve berichtet (Stoeckel 1979). Parallel zu diesem Wiederanstieg der Plasmakonzentration müßte auch eine Rückverteilung ins Gehirn stattfinden, was der Anlaß für die beobachteten Atemdepressionen sein könnte. Abgesehen von der Meßgenauigkeit des Fentanyl-RIAs im niedrigen Konzentrationsbereich bezweifeln einige Autoren die klinische Relevanz dieser sekundären Blutspiegelerhöhung, da sich der

Anstieg im subanalgetischen Konzentrationsbereich abspielt (Kamp 1982, Lehmann 1983).

Stoeckel (1979) versuchte den Fentanyl-Rebound mit dem Prinzip der gastro-entero-systemischen Rezirkulation zu erklären. Fentanyl wird als basische Substanz (pK_a -Wert 8,43) im sauren Mageninhalt angereichert. Beim pH-Wert des Blutes ist der nichtionisierte und damit membranpermeable Anteil an Fentanyl ca. 10 000mal so groß wie beim pH-Wert des Magens. Fentanyl kann deshalb die Magenwand von der Blutseite her durchdringen und wird im Magen als Kation festgehalten, da dieses die Magenwand nicht mehr passieren kann (sog. "ion-trapping"). Durch die postoperativ wieder einsetzende Peristaltik des Magens gelangt das in den Magen sequestrierte Fentanyl in den Dünndarm (pH 6-8), könnte dort rückresorbiert werden und dann zu einem sekundären klinisch relevanten Anstieg der Blutspiegelkurve führen (Stoeckel 1979, 1982). Gegen diese Hypothese sprechen Untersuchungen von Blutspiegelwerten bei freiwilligen Versuchspersonen nach Applikation von 15 % der üblichen intravenösen Fentanyldosis über eine Magensonde (Lehmann et al. 1982 a), die nur einen Anstieg der Plasmakonzentration im Bereich der Nachweisgrenze des Fentanyl-RIAs ergaben und damit unter 1 ng/ml blieben.

Als weitere Erklärungsmöglichkeit für postnarkotische Atemdepressionen wurde besonders von Lehmann (1981) die in ihrer Bedeutung evtl. unterschätzte Biotransformation von Fentanyl herangezogen. Es wurde die Frage gestellt, ob nicht andere, gleichzeitig verabreichte Narkosemedikamente Interaktionen mit dem Fentanylabbau verursachen könnten. Eine Hemmung dieses Abbaus müßte zu erhöhten Plasmakonzentrationen führen. Bei eingehenden Untersuchungen zu diesem Problem (Lehmann et al. 1982 b) verursachte nur Halothan akut eine Hemmung Fentanylabbauender Leberenzyme, während chronische Vorbehandlungen mit verschiedenen Pharmaka keine bedeutsame Änderung am Metabolitenmuster bewirkte (Lehmann 1983).

Schließlich besteht auch die Möglichkeit, daß Metaboliten mit Opiatpotenz entstehen, die beim Auftreten im Gehirn zu Atemdepressionen führen können. Die Frage nach der Wirksamkeit wurde bisher für die Produkte der oxidativen N-Dealkylierung der Phenethylseitenkette negativ beantwortet (Soudijn 1978). Allerdings beschränkte sich die Betrachtung der Metabolisierung nur auf diesen Hauptabbauweg des Fentanyl (Wijngaarden 1968, Maruyama 1969, Hess 1971). In neueren Arbeiten wird über das Auftreten von verschiedenen Hydroxylierungsprodukten berichtet (Frincke 1980, Lehmann 1981, Goromaru 1981), von denen einige in Rezeptorbindungsstudien durchaus Opiataktivität zeigten (Lobbezoo 1980, Wenqiao 1981).

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, durch Ganzkörperautoradiographien die Organverteilung von intravenös appliziertem Fentanyl bei der Ratte bildlich zu erfassen, um dabei Anhaltspunkte für die Hypothese der Rückverteilung ins Gehirn zu finden. Da Autoradiographien nur die Verteilung der Gesamtaktivität zeigen, sollen durch radiochromatographische Analysen genauere Aussagen über das quantitative Metabolitenmuster der Organe und damit über die Anreicherung bestimmter Metaboliten erhalten werden. Zur Prüfung der von Stoeckel postulierten gastroenterosystemischen Rezirkulation werden Blutspiegel, Organverteilung und Metabolitenmuster nach oraler Gabe von Fentanyl bei der Ratte analysiert. Um zu klären, welchen der bekannten Metaboliten des Fentanyls opioide Wirkung zukommt, soll mit Hilfe eines Bioassays versucht werden, vergleichbare Daten über ihre Opiatpotenz zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Alle Untersuchungen zur Ganzkörperautoradiographie und zum Metabolitenmuster der Organe wurden an weiblichen Wistar Ratten (Tierzucht Hannover) mit einem Körpergewicht von $200 \text{ g} \pm 15 \text{ g}$ durchgeführt. Futter (Herilan Standarddiät für Ratten, Firma Eggersmann, Rinteln) und Leitungswasser in Saugflaschen wurden den Tieren bis kurz vor Versuchsbeginn ad libitum angeboten. Die intravenöse Injektion erfolgte über einen Polyäthylenkatheter (0,5 mm Innen-, 1 mm Außendurchmesser, Intramedic PE-50; Clay Adams, Parsippany N.J., USA), der in die Vena femoralis eingebunden war, wobei der Katheter möglichst weit in Richtung auf die Vereinigung zur Vena cava vorgeschoben wurde. Die Operation wurde in Chloralhydratnarkose (300 mg/kg in $0,5 \text{ ml}$ Wasser, intraperitoneal) durchgeführt und die Wunde anschließend mit Histoacryl-Wundkleber (Braun, Melsungen) versorgt. Zur Injektion, die nach dem Aufwachen erfolgte, wurden die Ratten in einen Bollman-Restriktionskäfig gesetzt, damit sie den Katheter nicht selbst wieder entfernen konnten (Bollman 1948, Brune 1971). Bei den sofort nach Injektion getöteten Tieren betrug die Injektionsdauer ca. 2 Minuten, für die anderen Versuchszeiten war eine Kurzinfusion über 9 Minuten nötig, um Atemstillstand während der Applikation zu vermeiden. Die Dosis betrug für (^3H -Phenetyl)-Fentanyl (siehe Kapitel 2.7) $300 \text{ } \mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ Körpergewicht, entsprechend $5,96 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ g}$; bei (^{14}C -Anilino)Fentanyl $1,82 \text{ } \mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ Körpergewicht entsprechend $6 \text{ } \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Nach Präparation des Citratsalzes (vgl. Kapitel 2.7) wurde dieses in 1 ml $0,9 \%$ Kochsalzlösung gelöst und der Katheter nach der Injektion mit $0,2 \text{ ml}$ Kochsalzlösung nachgespült.

Für die Untersuchungen nach intragastraler Gabe von Fentanyl wurden $300 \text{ } \mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ (entsprechend

5,96 µg/100 g) ^3H -Phenetyl)-Fentanyl-Citrat in 0,5 ml Wasser mittels Schlundsonde appliziert, anschließend der Femoraliskatheter in Äthernarkose gelegt und die Ratte zur Blutentnahme in den Bollman-Käfig gesetzt. Bei allen Tieren erfolgte die Entnahme der Blutproben ebenfalls über den Katheter zu den im Kapitel Blutspiegelkurven angegebenen Zeiten mittels heparinisierten 50 µl Einmal-Mikropipetten (Blaubrand Intra-Mark, Brand, Wertheim). Sofort nach Injektion und zu den Zeiten 10, 30, 90 und 270 Minuten p.i. wurde je 1 Tier für die Ganzkörperautoradiographie präpariert (siehe Kapitel 2.2) und nach (^3H -Phenetyl)Fentanylapplikation zusätzlich 2-4 Tieren Organe für Analysen entnommen, gewogen und sofort eingefroren.

2.2 Ganzkörperautoradiographie

Um die Organverteilung von Fentanyl am Ganztier sichtbar zu machen, wurden von den Ratten Längsschnitte angefertigt und diese auf Röntgenfilm exponiert, auf dem sich eine Anhäufung radioaktiven Materials im Schnitt durch entsprechende Schwärzung zu erkennen gab. Technik und Durchführung der Ganzkörperautoradiographie wurden ausführlich von Ullberg (1977) und Curtis (1981) beschrieben. In Abb. 2.1 ist ein Ablaufschema der einzelnen Arbeitsschritte dargestellt. Zunächst wurden die Tiere in Äthernarkose durch Entbluten (Carotisschnitt) getötet und rasiert, da das dichte Haarkleid sich beim Einbetten schlecht benetzt und beim Schneiden hinderlich wäre. Anschließend wurden sie in gestreckter Haltung im Kältebad aus n-Hexan/Trockeneis (-70°C) schockgefroren und in einer Kastenform mit 2 % Methylcellulosekleister eingebettet. Dieser Block wurde ebenfalls im Kältebad durchgefroren. Auf dem PMV-Cryomikrotom 160 MP (LKB, Bromma, Schweden) wurden von diesen Blöcken 40 µm dicke Schnitte aus Ebenen, die alle Organe zeigen, hergestellt und auf

Klebefolie (Scotch Tape, 3M, Neuss) fixiert. Nach dem Gefriertrocknen der Schnitte erfolgte die Exposition auf dem speziellen Röntgenfilm Ultrafilm 3H (LKB, Bromma, Schweden), die bei ^3H -Fentanyl 4 Wochen, bei ^{14}C -Fentanyl 6 Wochen betrug. Die befilmten Schnitte lagerten während der Exposition bei -20°C . Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Röntgenfilme gemäß Herstellerangaben in Roe-Entwickler G 150 (Agfa, Leverkusen) entwickelt und mit Roe-Fix G 334 (Agfa, Leverkusen) fixiert.

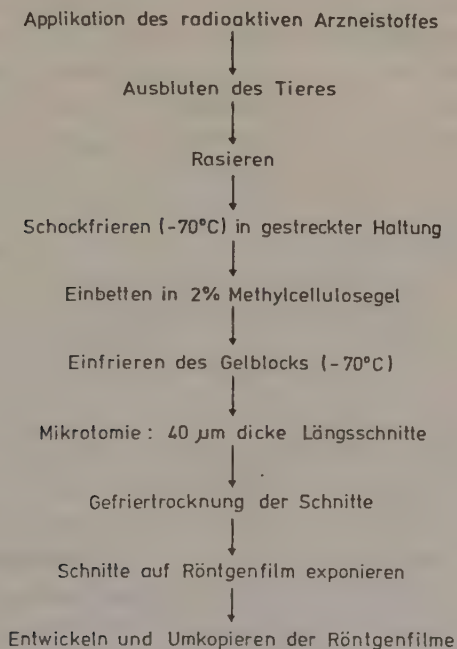


Abb. 2.1

Schematische Darstellung der Arbeitsgänge bei der Ganzkörperautoradiographie

2.3 Bestimmung der Gesamtradioaktivität in Blut und Organen

Zur Aufnahme von Blutspiegelkurven wurden zu jedem Zeitpunkt (siehe Blutspiegelkurven Kapitel 3.2.1) 2 Vollblutproben von je 50 μ l zur Ermittlung der Gesamtaktivität entnommen und eine weitere Probe in 450 μ l TRIS-Puffer pH=8 pipettiert. Diese Probe wurde mit 500 μ l n-Hexan ausgeschüttelt und von der wässrigen und der Hexanphase je 2 Proben a 100 μ l zur Radioaktivitätsbestimmung verwendet. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen ergaben, daß die Hexanphase nur ^3H -Fentanyl enthielt. Da die direkte Probenentnahme von den Ganzkörperschnitten keine eindeutigen Ergebnisse erbrachten (Patschke 1968), erfolgte die Gesamtaktivitätsbestimmung der Organe aus Material, das von den Blöcken abgekratzt wurde bzw. aus den Organen der zusätzlich präparierten Tiere. Organ- und Blutproben sowie die wässrige Phase der Hexanausschüttlung mußten zur Radioaktivitätsbestimmung nach dem Verfahren der chemischen Gewebssolubilisation aufbereitet werden (Koboyasai 1978). Dazu wurden Organproben (< 50 mg) bzw. Blutproben (50 μ l) mit einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Protosol Tissue Solubilizer (NEN, Boston Mass., USA) 30 Minuten bei 60°C gehalten. Zur Entfärbung diente die Zugabe von 250 μ l Wasserstoffperoxid 30 % und zur Neutralisation die Zugabe von 250 μ l 1N Essigsäure. Anschließend erfolgte die Radioaktivitätsmessung mittels Flüssigszintillationszählung (LSC). Nach Zugabe von 7 ml LSC-Cocktail Ready Solv MP (Beckman, München) wurden die Proben auf dem Flüssigszintillationszähler Beckman LS 9000 gemessen. Die Quenchkorrektur erfolgte automatisch nach der Extern-Standard-Methode. Für ^3H - bzw. ^{14}C -Zählung kalibrierte Programme des LSC-Zählers besorgten die Umrechnung der Zählrate in Zerfälle pro Minute (dpm). Die dpm-Werte der Proben wurden weiterhin in $\mu\text{Ci/ml}$ Vollblut bzw. $\mu\text{Ci/g}$ Organ ($1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$) und unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der verwendeten Substanzen in pMol/g bzw. pMol/ml umgerechnet.

2.4 Radiochromatographische Methoden

2.4.1 Prächromatographische Extraktionsverfahren

Von den mit (^3H -Phenethyl)-Fentanyl behandelten Tieren standen neben den Proben der Autoradiographieblöcke auch folgende Organe der zusätzlich behandelten Tiere zur Verfügung: Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Magenwand, Mageninhalt, Dünndarmwand, Dünndarminhalt, Nieren, Fett (Mesenterialfett), Muskel (M. gluteus). Wegen der hohen spezifischen Aktivität konnte die Probenmenge unter 50 mg gehalten werden. Um möglichst alle radioaktiven Substanzen zu extrahieren, wurde das in Abb. 2.4.1 dargestellte Aufbereitungsschema gewählt.

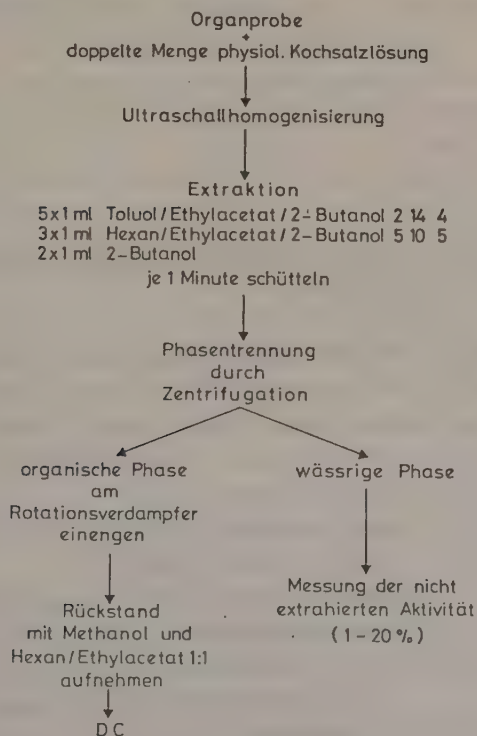


Abb. 2.4.1

Schematische Darstellung des Extraktionsverfahrens der Metaboliten von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl

Rückmessungen ergaben eine Ausbeute an extrahierter Radioaktivität von 80-99 %. Diese Methode erwies sich bei den nur von den Autoradiographieblöcken gewonnenen Proben mit (^{14}C -Anilino)-Fentanyl als ungeeignet. Da wegen der geringen spezifischen Aktivität Probenmengen von 200 bis 800 mg nötig waren, wurden dabei zu viele Zellbestandteile mitextrahiert, die bei der anschließenden chromatographischen Auftrennung störten. Deshalb wurden diese Proben ähnlich wie bei Lehmann et al. (1982b) mit 1 ml Methanol homogenisiert (Ultraschallstab, 60 W, 2-3 Min.; Sonifier Cell Disruptor, Ultrasonics Inc. Plainview USA), 1/2 Stunde geschüttelt und nach dem Zentrifugieren (4000 x g, 5 Min.) die Methanolphase abgehoben. Die Zelltrümmer wurden nochmals mit 500 μl Methanol extrahiert und die Methanolphase mit der ersten vereinigt, eingengt und direkt auf die Dünnschichtplatten aufgetragen. Ein Vergleich der beiden Extraktionsverfahren erbrachte ihre Gleichwertigkeit hinsichtlich Ausbeute und Metabolitenmuster.

2.4.2 Dünnschichtchromatographische Trennung basischer Fentanyl-Metaboliten

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Metabolitenmusters wurden die Organextrakte mittels Hochleistungs-dünnschichtchromatographie (HPTLC) aufgetrennt.

Plattenmaterial: HPTLC-Platten Kieselgel 60, 10x10 (Merck, Darmstadt).

Auftragmenge: Die abgedampften Extrakte wurden mit 30 μl Methanol bzw. n-Hexan/Ethylacetat 1:1 aufgenommen und streifenförmig aufgetragen. Die Gläser wurden mit weiteren 30 μl gespült und diese Menge ebenfalls aufgetragen.

Laufmittel A:	Toluol/Chloroform/Pyridin/Diethylamin 10+2+2+1, aufsteigende Entwicklung.
Vergleichs- substanzen:	Fentanyl und seine basischen Metaboliten (vgl. Kapitel 2.7: Substanzen) waren auf allen Platten zum Vergleich punktförmig aufgetragen.
Detektion der Vergleichs- substanzen:	Dragendorffs Reagenz nach Munier und Macheboeuf (Vorschrift Nr. 121 in: Anfärbereagenzien für DC, Merck, Darmstadt 1980).

2.4.3 Dünnschichtchromatographische Trennung saurer Metaboliten und deren Konjugate

Da sich die bei der metabolischen Abspaltung der Phenethylseitenkette entstehenden Säuren im basischen Laufmittelsystem nicht auftrennen ließen, wurde die Fraktion mit R_f 0-10 von den Basenchromatogrammen abgekratzt und eluiert. Es zeigte sich jedoch, daß auf diese Weise zu wenig Material für Tests auf Konjugate, die im Phase II-Metabolismus aus den Säuren gebildet werden können, zur Verfügung stand (100-300 mg Organ). Deshalb wurden Extrakte von angesäuerten Organhomogenaten nach dem in Abb.

2.4.3.1 wiedergegebenen Schema hergestellt und chromatographisch aufgetrennt.

Plattenmaterial:	HPTLC-Platten Kieselgel 60, 10x10 (Merck, Darmstadt).
Auftragemenge:	2x30 µl streifenförmig.
Laufmittel B:	Chloroform/Ameisensäure/Diisopropyl- ether 5+1+1, aufsteigende Entwicklung.
Vergleichs- substanzen:	Saure Metabolite (vgl. Kapitel 2.7: Substanzen).
Detektion der Vergleichs- substanzen:	Durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm.

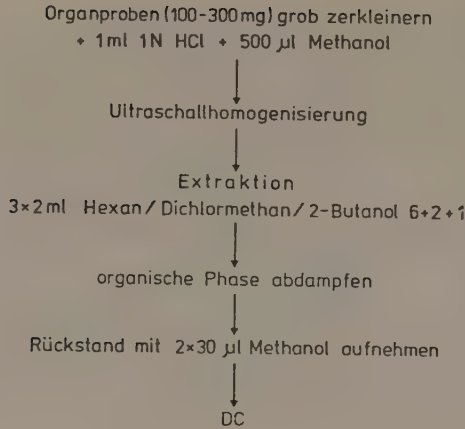


Abb. 2.4.3.1

Schematische Darstellung der Extraktion saurer Metaboliten aus Organproben mit (^3H -Phenethyl)-Fentanyl behandelte Ratten

Mit den Konjugatsspaltungstests wurde durch β -Glucuronidase (5,5 U/ml)-Arylsulfatase (2,6 U/ml) (Boehringer, Mannheim) versucht, Glucuron- und Schwefelsäurekonjugate und durch Behandlung mit Perchlorsäure vor allem Glycin-konjugate nachzuweisen. In Abb. 2.4.3.2 ist der Ablauf der Umsetzung schematisch dargestellt.

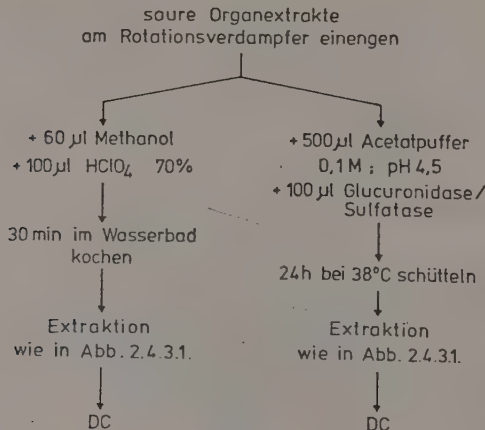


Abb. 2.4.3.2

Schema der Umsetzung saurer Organextrakte beim Test auf Konjugate

2.4.4 Derivatisierungsversuche zur weiteren Auftrennung der Fentanylfraktion

Aufgrund des chromatographischen Verhaltens einiger Vergleichssubstanzen auf den HPTLC-Platten der Basentrennung war zu vermuten, daß in der Fentanyl-Fraktion (hR_f 55-70) mehrere Substanzen enthalten sind. Da auch die Auftrennung in anderen Laufmittelsystemen nicht gelang, vor allem die Trennung von Fentanyl und Hydroxy-Fentanyl bereitete Schwierigkeiten, wurde mit Benzoylchlorid derivatisiert (Organikum 1974). Das Ablaufschema dieser Umsetzung ist in Abb. 2.4.4 wiedergegeben.

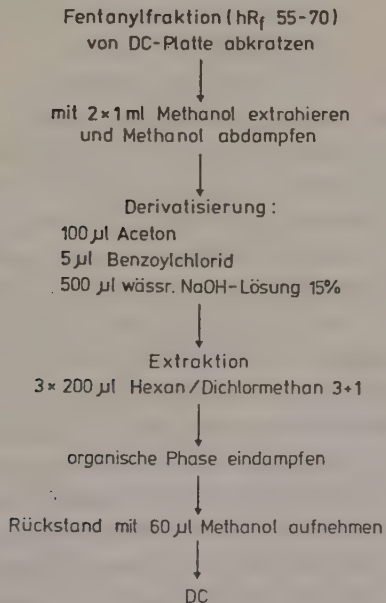


Abb. 2.4.4

Ablaufschema der Derivatisierung der Fentanylfraktion mit Benzoylchlorid

Plattenmaterial:	HPTLC-Platten Kieselgel 60 10x10 (Merck, Darmstadt).
Laufmittel C:	Aceton/Tetrahydrofuran/Eisessig 7+2+1, aufsteigende Entwicklung.
Vergleichs- substanzen:	N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propion- anilid α -Hydroxy-Fentanyl Fentanyl Despropionyl-Fentanyl. Diese waren ebenfalls gemäß Schema derivatisiert.

2.4.5 Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die quantitative Bestimmung des Metabolitenmusters von ^3H -Fentanyl erfolgte durch streifenförmiges Abkratzen der Kieselgelschicht von den DC-Platten im 5 mm bzw. 2,5 mm Abstand. Das Kieselgel wurde in Zählvials mit 1 ml Methanol 30 Min. eluiert und dann der LSC-Cocktail (7 ml Ready Solv MP Beckman) zugegeben. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte wie im Kapitel 2.3 angegeben. Zur Auswertung der Chromatogramme mit ^{14}C -Fentanyl-Metaboliten diente ein Berthold 2D -Dünnschicht-Scanner LB 276 (Berthold, Wildbad). Die Registrierung der qualitativen Radioaktivitätsverteilung auf den Chromatographieplatten erfolgte in Ratemeter-Darstellung, wobei aus der Lage der Kurven-Peaks die hR_f -Werte der markierten Metaboliten ermittelt wurden. Zur quantitativen Auswertung lieferte das Gerät Integrationskurven (Summenkurven der Zählraten), aus denen sich der prozentuale Anteil der einzelnen Peaks errechnen ließ (Wenzel 1974). Aus diesen Prozentzahlen wurden unter Heranziehung der Gesamtaktivität der einzelnen Organe die pMol/g -Werte der jeweiligen Metabolitenfraktion errechnet.

2.5 In vitro-Versuch zur Methylierung von Nor-Fentanyl

Von Nor-Morphin ist bekannt, daß es durch Methyltransferasen zum Morphin methyliert wird (Axelrod 1956, Clouet 1962). Um dies für Nor-Fentanyl nachzuweisen, sollte in vitro versucht werden, eine ^{14}C -Methylgruppe durch das Coenzym S-Adenosylmethionin (SAM) in das Molekül einzuführen und das entstehende ^{14}C -Methyl-Nor-Fentanyl nachzuweisen. Die Enzympräparation erfolgte durch Zentrifugation (10 Min., 9000 x g) eines Homogenats von Leber bzw. Gehirn der Ratte mit 4 Vol. Teilen 0,1 M Phosphatpuffer pH=7,3. Von diesem Überstand wurden nach Proteinbestimmung mit einer modifizierten Biuret-Methode (Wolff 1977) Portionen von je 12 mg Protein für den Reaktionsansatz verwendet.

Die Meßansätze enthielten je 10 ml:

Enzympräparation	mit 12 mg Protein
Nor-Fentanyl	50 μMole
^{14}C -SAM	1,2 μMole
MgCl_2	20 μMole
reduziertes Glutathion (Boehringer, Mannheim)	4 μMole
TRIS-Maleat-Puffer pH=5,5 (Sigma, St. Louis, USA)	375 μMole

Daneben diente zum Vergleich je ein Ansatz ohne Nor-Fentanyl bzw. ohne Protein. Die 1,2 $\mu\text{Mole}/10\text{ ml}$ ^{14}C -SAM setzen sich aus 593 μg nichtmarkiertem SAM (Boehringer, Mannheim) und 2,48 μg (= 0,2 μCi) ^{14}C -SAM (spezifische Aktivität 40 mCi/mMol; Amersham Buchler, Braunschweig) zusammen.

Nach einstündiger Inkubation der Reaktionsansätze im Schüttelbad bei 37°C wurde mit 50 % Trichloressigsäure gestoppt und zentrifugiert. Der mit Kochsalz gesättigte Überstand wurde mit 0,2 M Phosphatpuffer auf pH=10,3 eingestellt, 3mal mit 1 ml n-Hexan/Ethylacetat/2-Butanol (5+10+5) extrahiert und die organische Phase eingeeengt. Die chromatographische Identifizierung der entstandenen radioaktiv markierten Substanzen erfolgte analog dem für basische Metaboliten beschriebenen Verfahren (Kapitel 2.4.2 und 2.4.5).

2.6 Modell des isolierten, koaxial gereizten Meerschweinchenileums zur Bestimmung der Opiatpotenz

Das isolierte Meerschweinchenileum bewährte sich als Modell zur Bestimmung der relativen Opiatpotenz (Paton 1957, Gyang 1966, Kosterlitz 1968, Portughese 1981, Essawi 1983).

Meerschweinchen beiderlei Geschlechts wurden durch Genickschlag getötet und der Magen-Darm-Trakt sofort in vorgewärmter Krebs-Lösung (s. u.) präpariert (Blattner 1978). Zwei Zentimeter lange Ileumabschnitte aus dem Bereich oberhalb der Ileo-caecal-Klappe eigneten sich am besten für die Untersuchungen (Perry 1970). Die Darmstücke befanden sich während des Versuchs in einem auf 37°C temperierten Organbad nach Schuler (Firma Sachs, Hugstetten) mit 50 ml Organgefäßen in einer Organbadlösung nach Krebs folgender Zusammensetzung (aus Perry 1970):

NaCl	5,54	
KCl	0,35	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,29	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,37	
KH ₂ PO ₄	0,16	
NaHCO ₃	2,1	
Glucose	2,1	g auf 1 Liter Wasser

Zur Vermeidung von Ausfällungen wurde NaHCO_3 separat gelöst und erst dann der Lösung der restlichen Substanzen zugefügt.

Um Histamineffekte auszuschließen, wurde vor Versuchsbeginn jedem Organbad $0,125 \mu\text{M}$ Mepyramin (freundlicherweise von Firma Pfleger, Bamberg, überlassen) zugesetzt. Die Begasung der Organbäder erfolgte mit Carbogen ($95 \% \text{CO}_2 + 5 \% \text{O}_2$) (Linde, Nürnberg). Während der Versuche ruhte eine Vorlast von 1 g auf den Darmabschnitten. Zur elektrischen Reizung der Darmpräparate wurde die koaxiale Feldreizung nach Paton (1955) verwendet, die - wie in Abb. 2.6 dargestellt - modifiziert wurde.

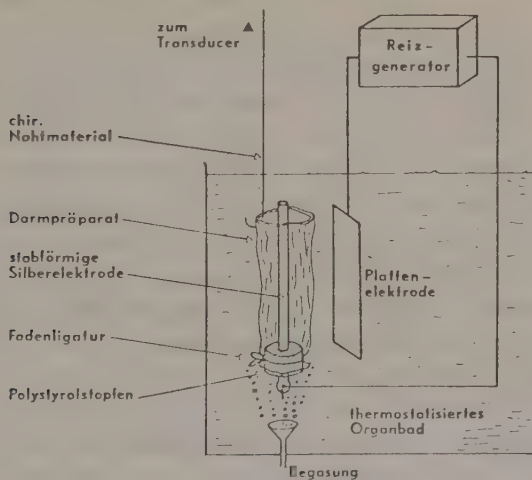


Abb. 2.6
Schematische Darstellung zur Versuchsanordnung der koaxialen Feldreizung des isolierten Meerschweinchenileums

Gereizt wurde mit supramaximalen Rechteckreizen (90 V) von $0,5 \text{ msec}$ Dauer und einer Frequenz von $0,1 \text{ Hz}$, die ein HSE Stimulator II M2 (Sachs, Hugstetten) erzeugte. Zur isometrischen Registrierung der daraus resultierenden

zuckenden Kontraktionen dienten die elektromechanischen Transducer STATHAM Universalzelle UC2 (Firma Sachs, Hugstetten), die mit einem WATANABE Thermoschnellschreiber Mark IV über einen HSE-Meßbrückenkoppler 550 A (Sachs, Hugstetten) verbunden waren. Gemessen wurde die mit steigenden Opioidkonzentrationen zunehmende Hemmung der durch elektrische Reizung bewirkten Kontraktionen der isolierten Darmabschnitte. Die Verringerung der Kontraktionsamplitude nach Opioidzugabe im Vergleich zum Ausgangswert wird in den Dosis-Wirkungs-Kurven als prozentualer Hemmwert gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Wirkstoffkonzentrationen aufgetragen. Zur Vermeidung von Toleranzerscheinungen wurde im Gegensatz zu den Angaben bei Kosterlitz (1968), der jede Konzentration 15-20 Min. auf die Darmstücke einwirken ließ, jeweils nach Erreichen des Hemmeffekts die nächsthöhere Konzentration zugegeben. Jedes Darmstück wurde nur für eine Konzentrationsreihe verwendet und dann verworfen. Die Prüfsubstanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, soweit es sich um Salze handelte. Sonst wurden die Basen durch Zugabe von äquimolaren Mengen Salzsäure gelöst. Substanzen aus Handelsampullen wurden direkt verdünnt. Als Vergleichssubstanzen bzw. als Antagonist dienten:

Morphin · HCl (Merck, Darmstadt)

Pethidin, Dolanthin^R Ampullen (50 mg/ml)
(Hoechst, Frankfurt)

Fentanyl Janssen^R Ampullen (0,5 mg/10 ml)
(Janssen Pharmaceutica, Neuss)

Naloxon · HCl
(Endo Laboratories, New York, USA)
bzw. Narcanti^R Ampullen (0,4 mg/ml)
(DuPont Pharma, Frankfurt)

Von den Fentanylmetaboliten und den noch nicht gelösten Vergleichssubstanzen wurden Stammlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

Fentanylcitrat(Eigensynthese)	786 µg/10 ml
Morphin • HCl	320 µg/10 ml
Naloxon • HCl	3,27 mg/ml
(p-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl	1,76 mg/ml
(α-Hydroxy-β-phenethyl)-Fentanyl	17,5 mg/ml
Nor-Fentanyl	115,2 mg/ml
N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid	153 mg/ml
Despropionyl-Fentanyl	17,3 mg/ml
1-Methyl-4-anilino-piperidin	44 mg/ml
4-Anilino-piperidin	88 mg/ml

Aus diesen Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen in Zehnerschritten angelegt und durch Vorversuche die kleinste Verdünnung ermittelt, die noch Wirksamkeit zeigt. Von dieser Verdünnung ausgehend, wurde - nach dem sich jeweils der Hemmeffekt eingestellt hatte - die nächsthöhere Verdünnung zupipettiert, ohne einen Spülvorgang zwischenzuschalten ("multiple dose" Methode, Kosterlitz 1968). Die Wirkstoffkonzentrationen ergeben sich aus der Aufsummierung der Konzentrationen der Verdünnungsreihen. Zu 50 ml Organbadflüssigkeit wurden von jeder Verdünnung 10 µl zugegeben und die Endkonzentrationen in die Dosis-Wirkungs-Kurven in Mol pro Liter eingetragen.

2.7 Substanzen

2.7.1 Laborchemikalien

Soweit nicht bei den einzelnen Substanzen angegeben, handelt es sich um Chemikalien mit p.A.- oder Arzneibuchqualität der Firma Merck, Darmstadt.

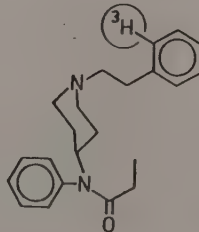
2.7.2 Vergleichs- und Prüfsubstanzen

Als Vergleichssubstanzen zur Identifizierung der basischen Fentanylmetaboliten wurden Nor-Fentanyl = N-(4-Piperidyl)-propionanilid, Despropionyl-Fentanyl = 1-Phenylethyl-4-anilinopiperidin, (p-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl = N-[1-(p-Hydroxy)-phenylethyl-4-piperidyl]-propionanilid und 4-Anilinopiperidin verwendet. Diese Substanzen wurden in kleinen Mengen freundlicherweise von der Firma Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien) zur Verfügung gestellt. Zur Identifizierung der sauren Metaboliten dienten folgende Vergleichssubstanzen, die von Sigma-Chemie (St. Louis, USA) geliefert wurden:

Phenylelessigsäure, p-Hydroxy-phenylelessigsäure,
3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure, Mandelsäure,
p-Hydroxy-mandelsäure, 3,4-Dihydroxy-mandelsäure.

Das für die Autoradiographien und zur Metabolitenbestimmung verwendete (^3H -Phenethyl)-Fentanyl war ein großzügiges Geschenk der Firma Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgien).

Der Tritiummarker wurde bei der Fa. IRE (Fleurus, Belgien) durch Jodaustausch in die Phenethylseitenkette eingebaut. Die spezifische Aktivität beträgt 17 Ci/mM.



Vor der Verabreichung an Versuchstiere wurde die in Ethanol gelöste Base mit der äquimolaren Menge Zitronensäure versetzt, das Lösungsmittel abgedampft und in der benötigten Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst (vgl. Kapitel 2.1).

2.8 Synthesen von Prüf- und Vergleichssubstanzen

Wegen der raschen metabolischen Abspaltung der Phenethylseitenkette konnte mit dem (^3H -Phenethyl)-Fentanyl die Verteilung des Grundkörpers nicht weiter verfolgt werden. Da weder von der Firma Janssen noch bei den Herstellern radioaktiver Substanzen im Grundgerüst markiertes Fentanyl zu erhalten war, sollte (^{14}C -Anilino)-Fentanyl selbst synthetisiert werden.

2.8.1 Allgemeines Syntheseschema

Fentanyl wurde in Anlehnung an die Patentsynthese von Janssen (1964) erhalten. Auf diesem Wege waren auch andere 1-substituierte N-(4-Piperidyl)-propionanilide (IV) zugänglich, die als Biotransformationsprodukte des Fentanyls in Frage kommen (Casy 1969). Wie Abb. 2.8.1 zeigt, werden diese Verbindungen durch eine dreistufige Synthese aus 1-Alkyl- bzw. 1-Arylalkyl-4-piperidon (I) erhalten.

2.8.2 Synthese von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl

Zunächst war es nötig, in Vorversuchen ohne radioaktive Substanzen eine Vereinfachung der Patentsynthese (Janssen 1964) zu finden, da die dort beschriebene Vakuumdestillation der Schiff'schen Base (II a) Probleme bereitete. Die besten Ergebnisse erbrachte die folgende Vorgehensweise:

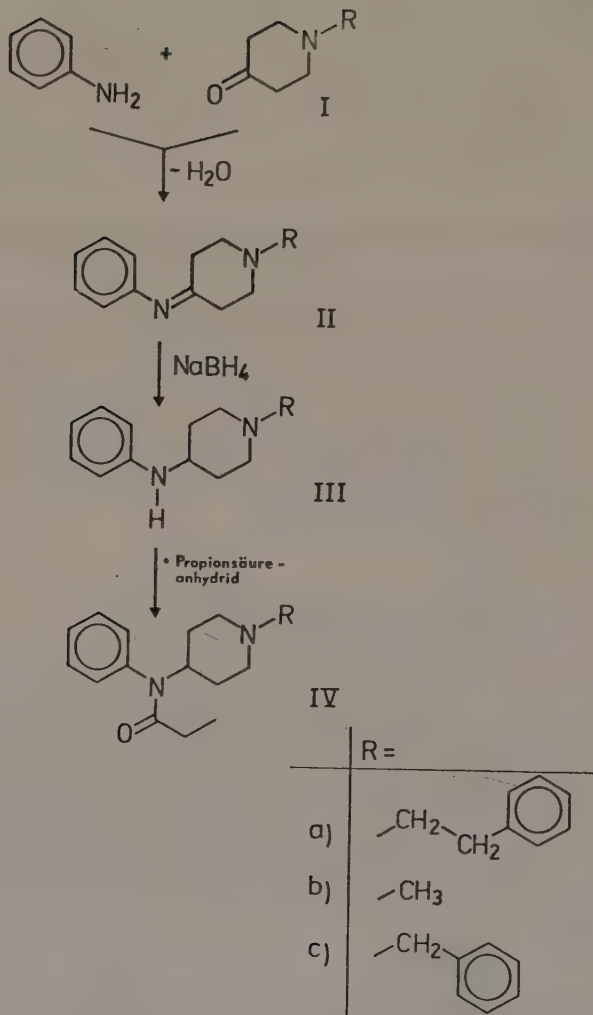


Abb. 2.8.1

Allgemeines Formelschema zur Synthese von 1-substituierten 4-Anilinopiperidinen

Despropionyl-Fentanyl = 1-Phenyl-4-anilinopiperidin
(III a)

100 mg N-(2-Phenylethyl)-4-piperidon (I a) (EGA-Chemie, Steinheim) und 65 mg Anilin wurden in 30 ml Toluol, zusammen mit Spuren von p-Toluolsulfonsäure als Katalysator, 5 Stunden über einen Wasserabscheider am Rückfluß auf 250°C (Luftbadtemperatur) erhitzt. Durch Ausschütteln mit Wasser wurde der Katalysator entfernt und die organische Phase sofort über Na₂SO₄ getrocknet. Im Wasserstrahlvakuum destillierte man das Toluol ab und nahm die verbleibende Schiff'sche Base (II a) mit 10 ml Methanol (wasserfrei) auf. Nach langsamer Zugabe von 200 mg Natriumborhydrid wurde 30 Minuten unter Rühren am Rückfluß gekocht. Danach ließ man erkalten, fügte 5 ml Wasser hinzu und schüttelte mit Petrolether aus. Im anschließenden Reinigungsschritt wurde die Petroletherphase mit 10 % Salzsäure ausgeschüttelt und nach Alkalisierung mit 5 % Natriumhydroxidlösung mit n-Hexan extrahiert. n-Hexan wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand mit Aceton aufgenommen.

Das HCl-Salz des Despropionyl-Fentanyls (III a) wurde durch Einleiten von HCl-Gas gefällt. Es ergaben sich 49,3 mg (28 % d. Th.) weiße Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 258-260°C. Auf dem Dünnschichtchromatogramm (DC) (Laufmittel A, vgl. Kapitel 2.4.2) zeigte sich nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz ein oranger Fleck bei $R_f \sim 55$. Die Verbindung verhielt sich damit wie die Vergleichssubstanz (siehe Kapitel 2.7).

C₁₉H₂₄N₂ (MG 280,41)

Fentanyl = N-(1-β-Phenethyl-4-piperidyl)-propionanilid
(IV a)

50 mg Despropionyl-Fentanyl · 2 HCl (III a) wurden in 1 ml Propionsäureanhydrid gelöst und am Magnetrührer 42 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 3 ml 15 % Natriumhydroxidlösung wurde mit Hexan ausgeschüttelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

abgezogen. Die Ausbeute an weißem Pulver betrug 33 mg (69 % d. Th.) mit einem Schmelzpunkt von 81-83° (Literaturangabe 82-84°, Casy 1969). Die Fentanyl-Base wurde in Ethanol gelöst und nach Zugabe der äquimolaren Menge Zitronensäure eingeengt. Das erhaltene Fentanyl-mono-citrat hatte einen Schmelzpunkt von 148° (Literaturwert 147-152°, Janssen 1964). Sowohl die Base als auch das Citratsalz zeigten am DC (Laufmittel A) das gleiche Verhalten wie die Vergleichssubstanz ($hR_f \sim 65$).

Base: $C_{22}H_{28}N_2O$ (MG 336,46)

Monocitrat: $C_{22}H_{28}N_2O$; $C_6H_8O_8$ (MG 528,58).

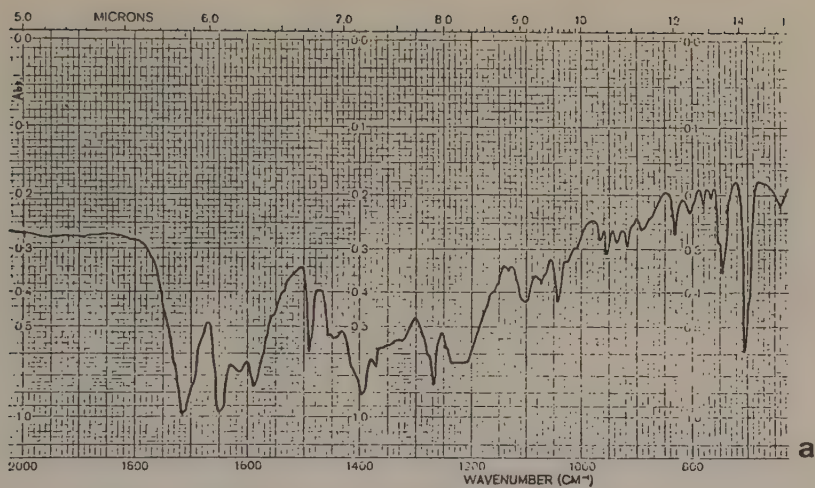
Das Infrarotspektrum von Fencylcitrat ist in Abb.

2.8.2.1a wiedergegeben. Für die Aufnahme des Spektrums danke ich Herrn Dr. H. Hahn, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

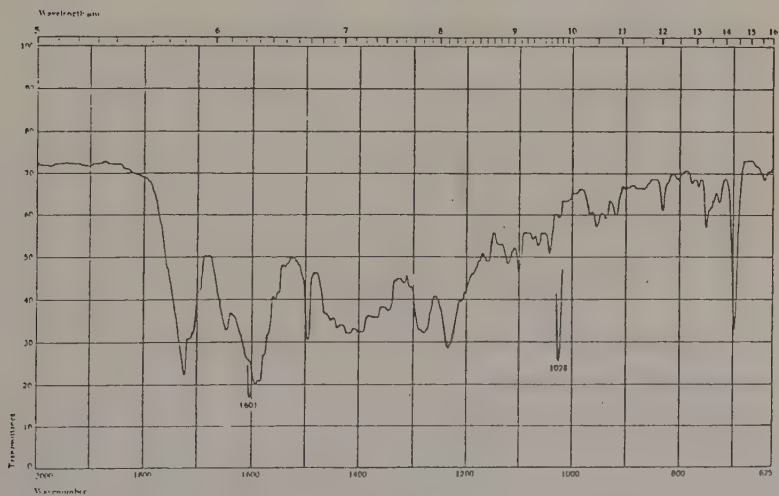
Abb. 2.8.2.1b zeigt zum Vergleich das Referenzspektrum aus der British Pharmacopoeia 1980.

(^{14}C -Anilino)-Fentanyl

Zur Einführung des radioaktiven Markers in das Fentanyl-molekül wurde ^{14}C -Anilin verwendet. Das von Amersham Buchler (Braunschweig) gelieferte (U- ^{14}C)-Anilin-hydrogensulfat (spezifische Aktivität 102 $\mu Ci/\mu M$) ergab 196,06 $\mu Ci \triangleq 1.92 \mu M$ freies ^{14}C -Anilin. Die Synthese erfolgte gemäß der oben angegebenen Vorschrift, wobei wegen der geringen Substanzmenge einige Änderungen nötig waren. 178,8 μg ^{14}C -Anilin und 500 μg N-(2-Phenethyl)-4-piperidon (I a) in 1,5 ml Toluol wurden mit einer Spur p-Toluolsulfonsäure 3 h am Wasserabscheider auf 250°C (Luftbad) erhitzt. Die Reduktion der Schiff'schen Base (II a) erfolgte mit 10 mg $NaBH_4$ in 1 ml wasserfreiem Methanol. Nach Reinigung betrug die Ausbeute an ^{14}C -Despropionyl-Fentanyl 44,3 % der eingesetzten Radioaktivität, bei einer radiochemischen Reinheit von 99 %. Die Strahlungsmessung erfolgte wie in Kapitel 2.3 bzw. 2.4.5 angegeben. Der restliche Teil der Radioaktivität verblieb



a



b

Abb. 2.8.2.1 a/b

Vergleich des Infrarotspektrums von synthetisiertem Fentanyl (KBr-Pressling) (a) mit dem Referenzspektrum der British Pharmacopoeia 1980 (b)

in Kühlfallen und den Reinigungsphasen.

^{14}C -Despropionyl-Fentanyl wurde mit 200 μl Propionsäureanhydrid aufgenommen und 3 Stunden bei 150°C gerührt. Nach Zugabe von 1 ml Wasser und 1,5 ml 15 % Natriumhydroxidlösung erfolgte die Extraktion mit Hexan.

Die Fentanylausbeute betrug 29 % der eingesetzten Anilin-Radioaktivität. Durch DC (Laufmittel A) wurde mit Referenzsubstanz und selbstsynthetisiertem Fentanyl die Identität bestimmt (hR_f 65). Mit der quantitativen Radiochromatographie ließ sich eine radiochemische Reinheit von 96 % ermitteln (Abb. 2.8.2.2).

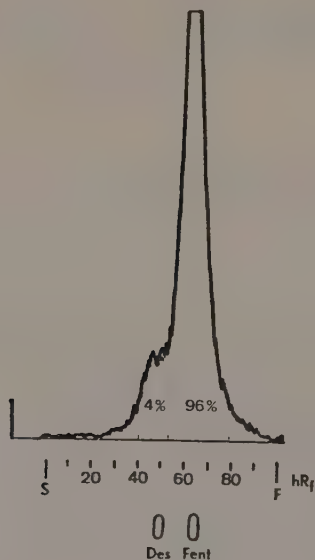
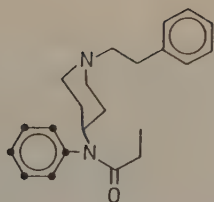


Abb. 2.8.2.2

Prüfung der radiochemischen Reinheit von (^{14}C -Anilino)Fentanyl durch quantitative Radiodünnschichtchromatographie. Die Abbildung zeigt die Ratemeterdarstellung des Chromatogramms (Ratemeter 10 000 counts, Zeitkonstante 10 s, Vorschub 300 mm/h). Die quantitativen Werte wurden aus der Integrationskurve ermittelt.

Vergleichssubstanzen: Des = Despropionyl-Fentanyl

Fent = Fentanyl



spezifische
Aktivität
102 $\mu\text{Ci}/\mu\text{M}$

• = ^{14}C

Für die Tierversuche wurde die in Ethanol bei -20°C aufbewahrte ^{14}C -Fentanyl-Base mit der äquimolaren Menge Zitronensäure versetzt, Ethanol abgedampft und mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

2.8.3 Synthese von möglichen Metaboliten des Fentanyls

N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid (IV b)

Die Synthese erfolgte nach einem von Casy 1969 beschriebenen Verfahren analog der eben beschriebenen Fentanyl-synthese. Gute Ausbeuten waren nur durch folgenden Ansatz zu erzielen: 2 g N-Methyl-4-piperidon (I b) (EGA-Chemie, Steinheim), 2,27 g Anilin in 15 ml Toluol und 3 mg p-Toluolsulfonsäure 3 Stunden am Wasserabscheider bei 250°C (Luftbad) gehalten, ergab 1,85 g (55 % d. Th.) N-Methyl-4-anilinopiperidin III b mit einem Schmelzpunkt von $80,5^\circ$ (Literaturangabe $81-82^\circ$, Casy 1969).

$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2$ (MG 190,29)

0,5 g dieser Substanz mit 2mal Propionsäureanhydrid 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, ergab nach Reinigung 0,29 g (45 % d. Th.) N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid (IV b). Schmelzpunkt der Base: $67-69^\circ$, HCl-Salz 264° (Literaturwert 265°C , Casy 1969).

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ (MG 246,35)

Auf dem DC (Laufmittel A) zeigt III b nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz einen Fleck mit $\text{hR}_f \sim 28$ und IV b einen mit $\text{hR}_f \sim 52$.

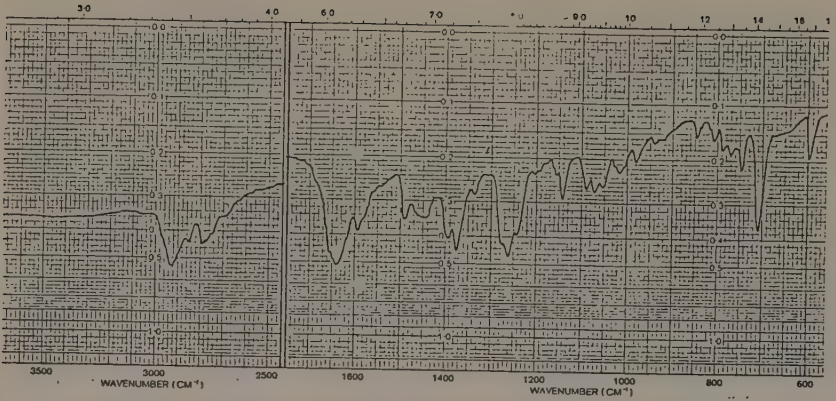


Abb. 2.8.3.1

Infrarotspektrum von *N*-(1-Methyl-4-piperidyl)propionanilid

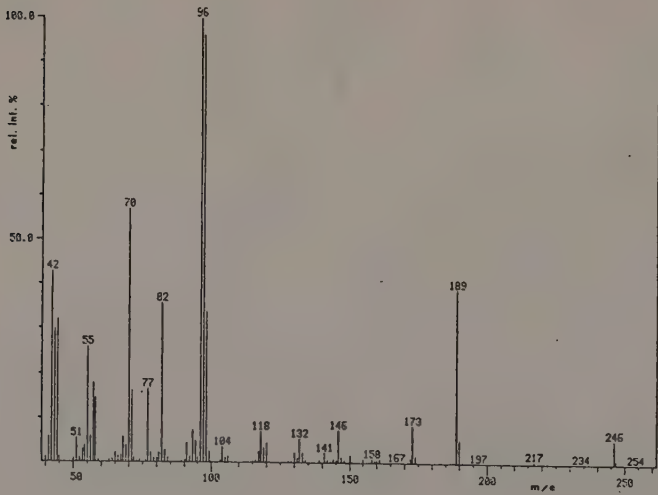


Abb. 2.8.3.2

Massenspektrum von *N*-(1-Methyl-4-piperidyl)propionanilid

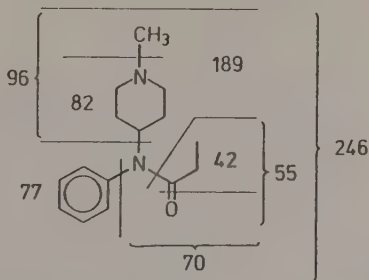
Das in Abb. 2.8.3.1 wiedergegebene Infrarotspektrum von IV b wurde, ebenso wie die anderen IR-Spektren, mit einem Perkin Elmer Grating Infrared Spectrometer 457 in einem KBr-Preßling aufgenommen, wofür ich Herrn Dr. H. Hahn und Herrn F. Gillich, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg, zu danken habe. Auf dem Spektrum sind folgende wichtige Absorptionsbanden zu sehen:

2900 cm^{-1}	Methyl- und Methylen-Gruppen
2800 cm^{-1}	Amine
1700 cm^{-1}	Säureamid
1350 cm^{-1}	C = O-Doppelbindung
700 - 800 cm^{-1}	aromatische C-H-Bindungen

Abb. 2.8.3.2 zeigt das Massenspektrum (MS) von IV b. Die Aufnahmen der MS-Spektren erfolgten mit einem Finnigan 4000 Massenspektrometer (Direkteinlaß, Stoßionisation 70 eV) und wurden freundlicherweise von Herrn D. Braun und Herrn R. Waibl, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg, angefertigt.

Das MS läßt die im Schema wiedergegebene Fragmentierung vermuten.

m/e	rel. Intensität
42	42
55	26
70	57
77	16
82	36
96	100
189	39
246	6 = M^+



"Nor-Fentanyl" = N-(4-Piperidyl)-propionanilid (V)

Zunächst wurde nach dem allgemeinen Synthesenschema (Abb. 2.8.1) N-(1-Benzyl-4-piperidyl)-propionanilid (IV c)- synthetisiert (Casy 1969). 10 g 1-Benzyl-4-piperidon (I c) (EGA-Chemie, Steinheim) und 7 g Anilin in 20 ml Toluol mit 5 mg p-Toluolsulfonsäure 3 Stunden bei 250°C (Luftbad) gehalten, ergab 7,1 g (54 % d. Th.) 1-Benzyl-4-anilinopiperidin (III c) mit einem Schmelzpunkt von 84-86° (Literaturwert 85-86°, Casy 1969).

C₁₈H₂₂N₂ (MG 266,38)

14,9 g III c wurden mit 10 ml Propionsäureanhydrid in 200 ml Toluol 3 h bei 200°C am Rückfluß erhitzt und ergaben 15,3 g (84,7 % d. Th.)

N-(1-Benzyl-4-piperidyl)-propionanilid (IV c). Mit HCl-Gas wurde in Aceton das Salz gefällt, dessen Schmelzpunkt 234° betrug (Literaturwert 235-237°, Casy 1969).

C₂₁H₂₆N₂O (MG 322,45)

Das DC (Laufmittel A) zeigte nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz für III c einen Fleck mit $R_F \sim 63$ und für IV c einen mit $R_F \sim 72$.

"Nor-Fentanyl" (V) kann durch katalytische Debenzylierung aus IV c erhalten werden (Hermans 1966) (Abb. 2.8.3.3).

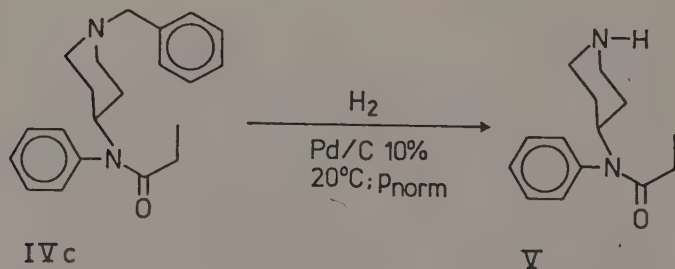


Abb. 2.8.3.3

Formelschema der reduktiven Debenzylierung von N-(1-Benzyl-4-piperidyl)-propionanilid

9 g N-(1-Benzyl-4-piperidyl)-propionanilid $\cdot$ 2 HCl (IV c) wurden in 35 ml Isopropanol und 35 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1 g Palladium/Kohle 10 % schüttelte man den Ansatz bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck unter Wasserstoff, bis die DC-Kontrolle vollständige Umsetzung zeigte (32 Std.). Der Katalysator wurde mit Celite 503 abfiltriert und das Lösungsmittel abgedampft. Umkristallisation der zähen gelblichen Masse aus Methanol ergab 4,3 g (79 % d. Th.) N-(4-Piperidyl)-propionanilid (V). Schmelzpunkt 81-83°C (Literaturwert 83-85°C, Janssen 1964). Auf dem DC (Laufmittel A) zeigte sich ein Fleck mit $R_F \sim 18$.

$C_{14}H_{20}N_2$ (MG 216,33).

" α -Hydroxy-Fentanyl" = N-[1-(α -Hydroxy- β -phenylethyl)-4-piperidyl]-propionanilid (VII)

Das Formelschema ist in Abb. 2.8.3.4 wiedergegeben (Wengio 1981). In einem Gemisch aus 100 ml Toluol und 2,5 g Triethylamin wurden 2,5 g "Nor-Fentanyl" (V) und 2,5 g ω -Bromacetophenon 1 h bei 200°C (Luftbad) am Rückfluß gehalten. Die Toluolphase wurde mit Wasser gewaschen und mit 10 % Salzsäure ausgeschüttelt. Nach Alkalisierung mit 15 % Natriumhydroxidlösung und Extraktion mit Toluol dampfte man die organische Phase ein. Der ölige Rückstand mit N-[1-(Benzoyl-methyl)-4-piperidyl]-propionanilid (VI) wurde in 100 ml Methanol (wasserfrei) gelöst und 1/2 Stunde mit 0,5 g $NaBH_4$ gekocht. Nach dem Erkalten und Zugabe von 100 ml Wasser wurde mit Diethylether extrahiert. Die nach dem Abdampfen des Ethers erhaltene braune Masse wurde aus Petrolether umkristallisiert, wobei sich 0,8 g (21 % d. Th.) weißlich-gelbe Kristalle von N-[1-(α -Hydroxy- β -phenylethyl)-4-piperidyl]-propionanilid (VII) ergaben. Der Schmelzpunkt lag bei 89-91°C. Die DC (Laufmittel A) zeigte einen Fleck mit $R_F \sim 60$.

$C_{22}H_{28}N_2O_2$ (MG 352,47).

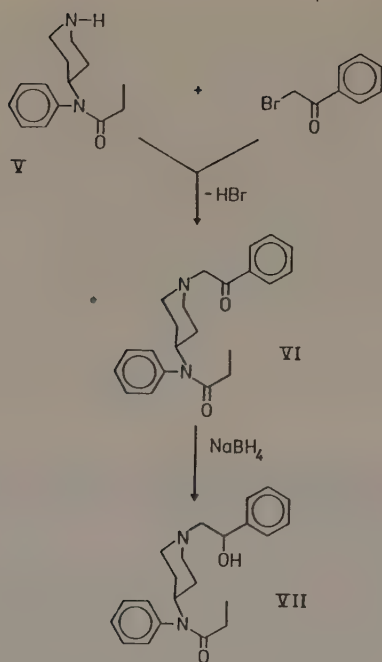


Abb. 2.8.3.4

Formelschema der Synthese von " α -Hydroxy-Fentanyl"

In Abb. 2.8.3.5 und 2.8.3.6 sind das Infrarotspektrum sowie das Massenspektrum (MS) wiedergegeben.

Auf dem Infrarotspektrum sind neben den vom Grundkörper herrührenden Banden (2900, 2800, 1700, 1600, 1350 cm⁻¹) zusätzlich bei 3400cm⁻¹ die Hydroxylbande und zwischen 700 und 800 cm⁻¹ zusätzliche aromatische C-H-Banden zu sehen. Das MS kann gemäß Fragmentierungsschema interpretiert werden. Durch die Stoßionisation wird wahrscheinlich eine Hydroxybenzylgruppe vom Grundkörper abgespalten, weshalb auch kein Moleküllion nachzuweisen ist.

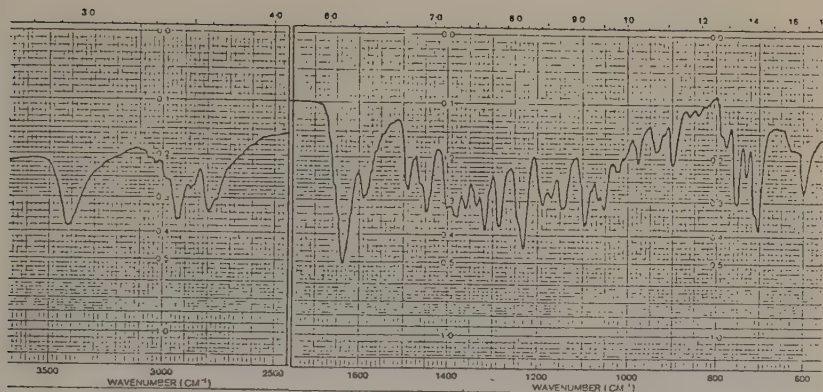


Abb. 2.8.3.5
Infrarotspektrum von "α-Hydroxy-Fentanyl"

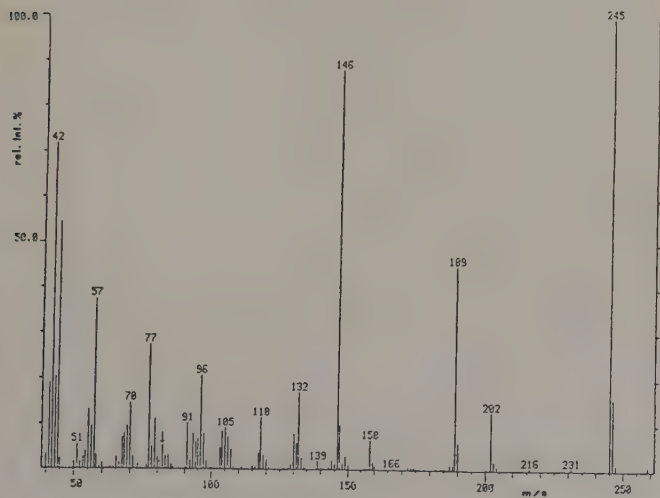
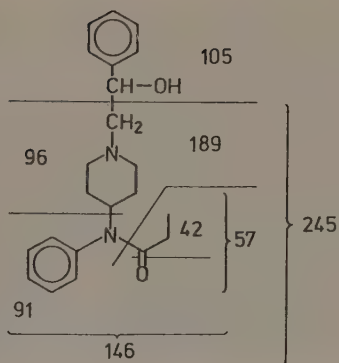


Abb. 2.8.3.6
Massenspektrum von "α-Hydroxy-Fentanyl"

m/e	rel. Intensität
42	71
57	38
91	10
96	20
105	10
146	88
189	45
245	100



Da durch die Einführung der Hydroxylgruppe ein optisches Zentrum entsteht, wurde die optische Drehung des Racemats in Methanol (Perkin Elmer Polarimeter 241, Na-Lampe 589 nm) gemessen. Der Drehwert beträgt 0°, d. h. die Enantiomere treten im Verhältnis 1:1 auf.

3. Ergebnisse

3.1 Qualitative Organverteilung von Fentanyl, dargestellt durch Ganzkörperautoradiographien

Die Methode der Ganzkörperautoradiographie erlaubt es, nach Applikation radioaktiv markierten Fentanyls die Organverteilung qualitativ zu erfassen.

3.1.1 Verteilung nach i. v. Injektion von (³H-Phenethyl)-Fentanyl

Die auf den Abbildungen als Kopien wiedergegebenen Autoradiographien von Rattenlängsschnitten zeigen den zeitlichen Verlauf der Organverteilung nach intravenöser Applikation von 300 µCi/100 g (³H-Phenethyl)-Fentanyl.

Sofort nach Injektionsende (Abb. 3.1.1.1)

Zu diesem Zeitpunkt findet sich der größte Teil der Radioaktivität im ZNS (Gehirn, Rückenmark), in der Lunge und im Myokard. Im Gehirn wird die graue Substanz stärker markiert als die weiße. Auffällig ist die Schwärzung des Films im Bereich des 4. Ventrikels. Dies ist von Bedeutung, da sich in dieser Gehirnregion auch die atemregulatorischen Zentren befinden. Im Rückenmark ist die zentral gelegene graue Substanz stärker markiert als die außen gelegene weiße. Lunge und Myokard zeigen ebenfalls überdurchschnittlich hohe Anreicherung von radioaktivem Material. Beide Organe werden sehr gut durchblutet.

Nur sehr schwache Markierung findet sich in der Leber, wo eine Fleckenstruktur angedeutet ist, und in den Zotten des Dünndarms sowie in der Nierenrinde. Die auf den Bildern erkennbare Verteilung wird durch die quantitativen Werte aus dem Gesamtaktivitätsdiagramm unterstrichen.

10 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.1.2)

Das Gehirn enthält nur noch geringe Mengen an radioaktiver Substanz, während die Lunge noch stark markiert ist. Es hat eine deutliche Umverteilung aus dem ZNS heraus

in die metabolisch und exkretorisch aktiven Organe stattgefunden. Die Leber erscheint einheitlich markiert, und die Niere zeigt hohe Konzentrationen in Mark und Rinde, während Kelche und Becken noch frei von Radioaktivität sind. Im Bereich der Wand des Drüsenmagens kommt es zu einer Anreicherung von Radioaktivität, die auf die beginnende Sequestrierung des basischen Pentanyls in den Magen zurückzuführen ist.

Auffällig ist auch eine leichte Markierung von Knochenmark sowie Speichel- und Tränendrüsen.

Das Diagramm der Organaktivitäten verdeutlicht die beginnende Umverteilung aus Gehirn in Leber, GI-Trakt, Niere und Lunge.

30 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.1.3)

Auf den ersten Blick erscheint der Schnitt einheitlich, d. h. das radioaktive Material ist gleichmäßig im Körper verteilt. Lediglich die vergleichsweise geringe Markierung des Gehirns und die starke Anreicherung im oberen Teil des Dünndarms und in der Niere sind auffällig. Die Gallengänge in der sonst gleichmäßig geschwärzten Leber zeigen ähnlich starke Markierung wie der Dünndarm (vgl. Abb. 3.1.1.6). Im Mageninhalt zeigt sich eine weiter zunehmende Sequestrierung von Substanzen. Die Meßwerte der Organradioaktivität bestätigen diese Umverteilung in Leber, Magen, Darm und Niere.

90 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.1.4)

Nach der im vorhergehenden Schnitt erkennbaren gleichmäßigen Verteilung der Radioaktivität im Tier zeigt diese Autoradiographie wieder eine Konzentrierung in wenigen Organen. Die Leber ist nur mehr schwach markiert, ebenso die Niere. Nur das Nierenbecken ist deutlich zu sehen. Dagegen sind Magen und Dünndarm prominent geschwärzt. Schwärzung der Haut im Bereich der Analgegend deutet darauf hin, daß bereits Aktivität mit dem Harn abgegeben wurde. Die Werte der Organradioaktivitätsbestimmung zeigen deutlich den weiterhin bestehenden Trend der Anreicherung im Darm.

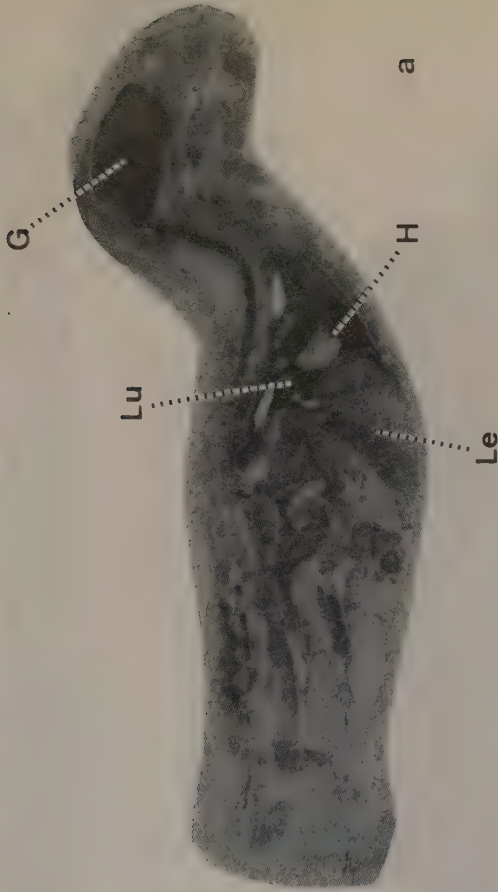
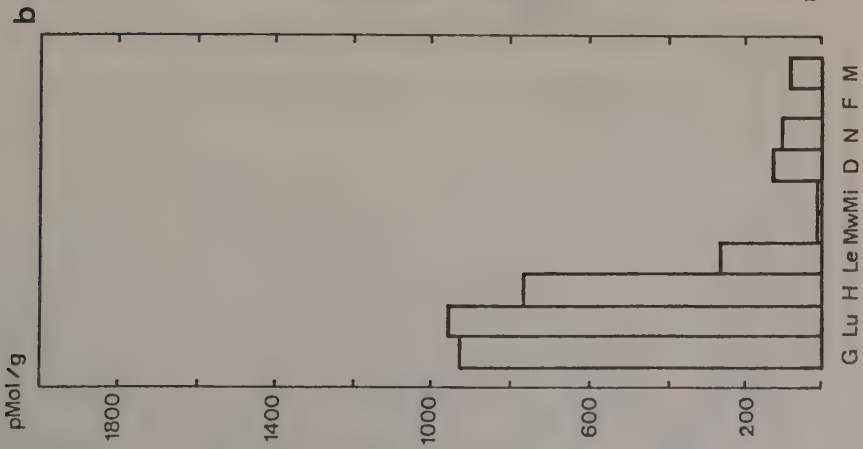


Abb. 3.1.1.1

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts **sofort** nach intravenöser Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} \pm 5,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

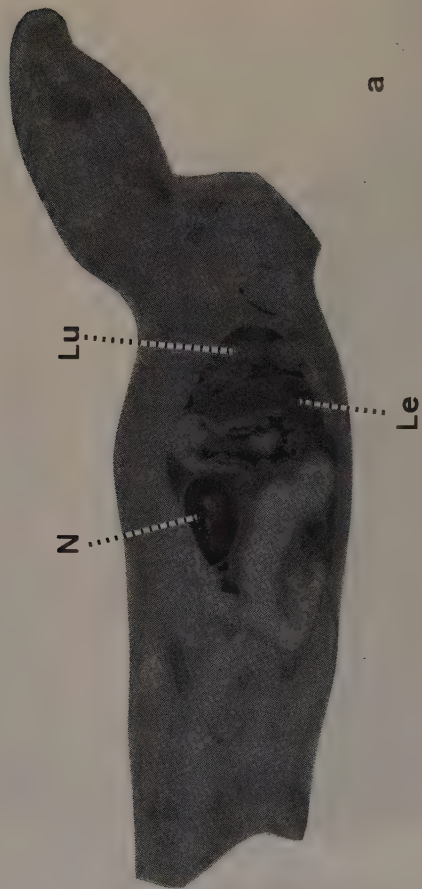
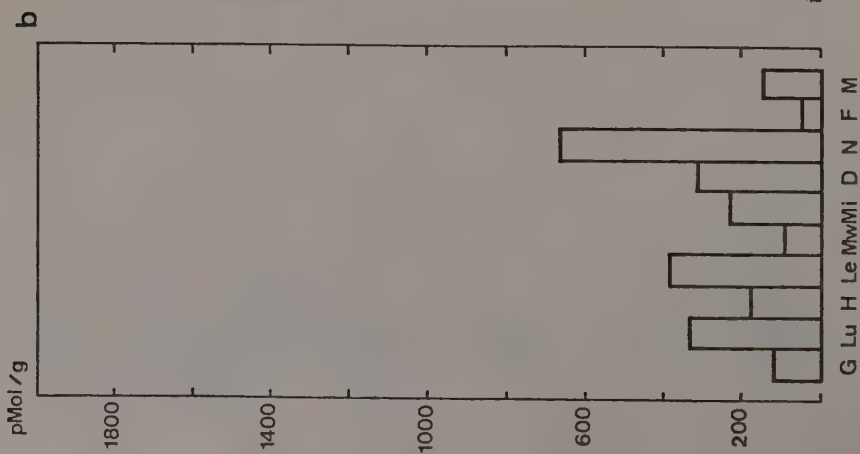


Abb. 3.1.1.2

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 10 Min. nach intravenöser Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 5.96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

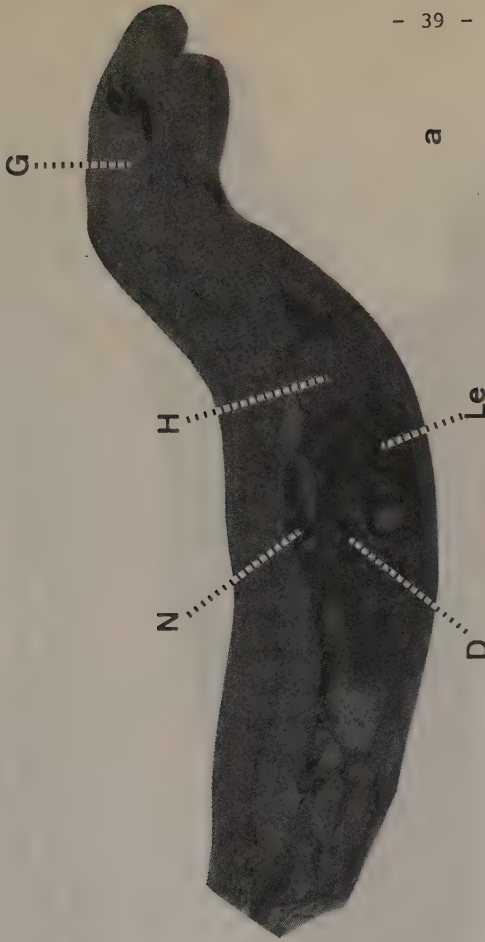
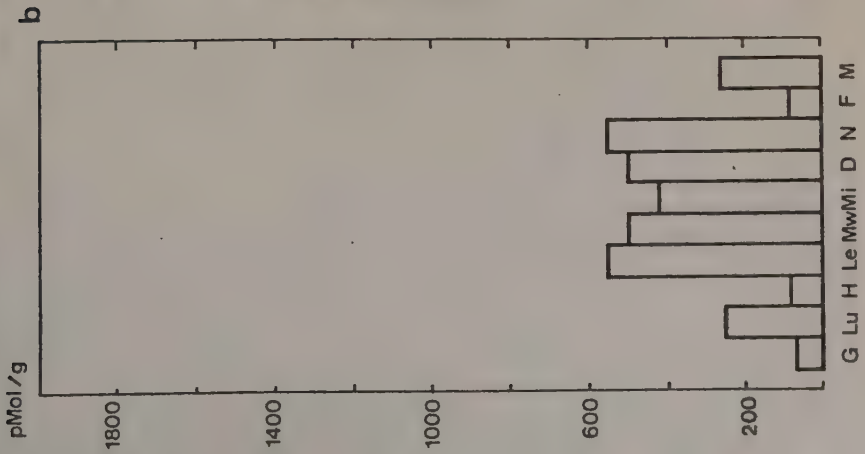


Abb. 3.1.1.3

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 30 Min. nach intravenöser Infektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 5,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

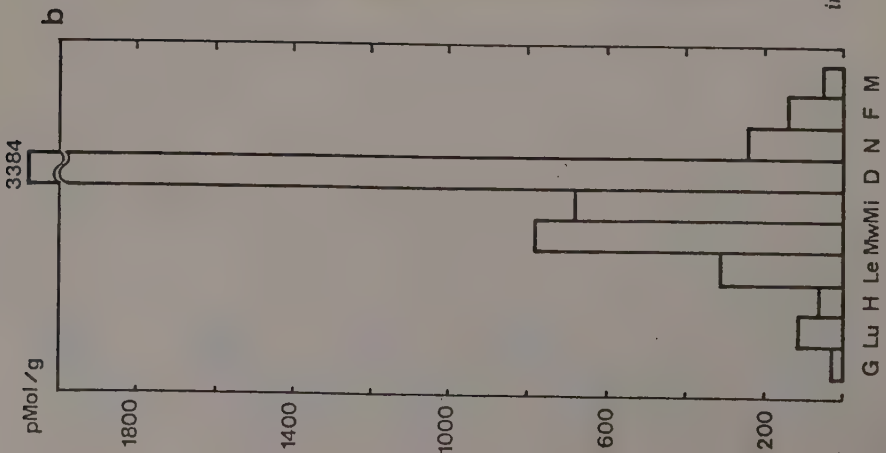
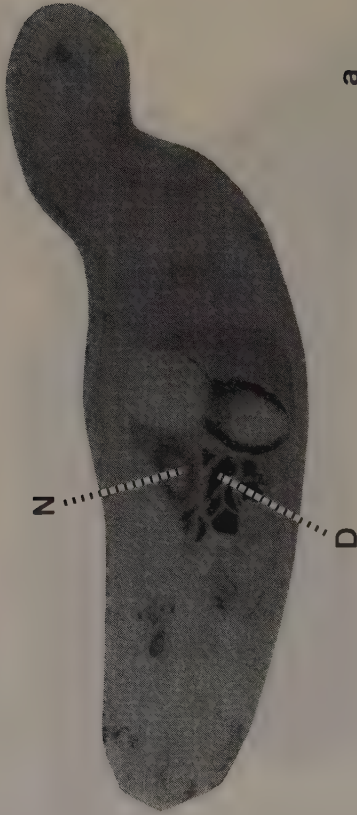


Abb. 3.1.1.4

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 90 Min. nach intravenöser Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 5,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel



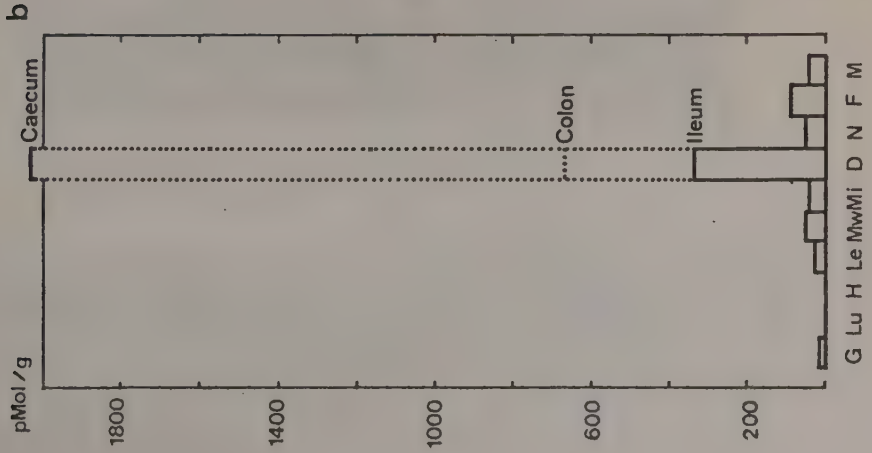
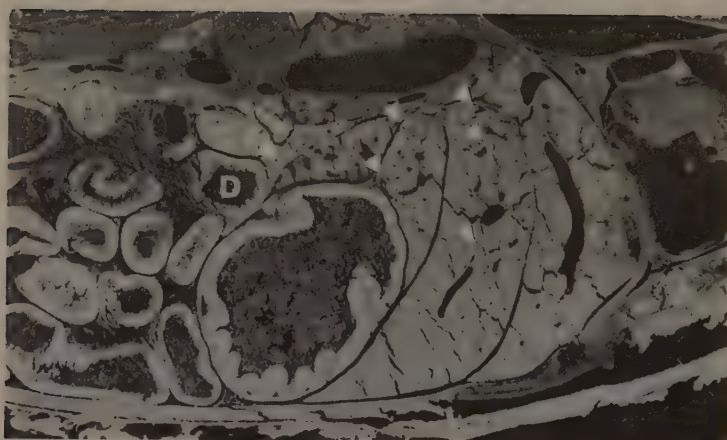


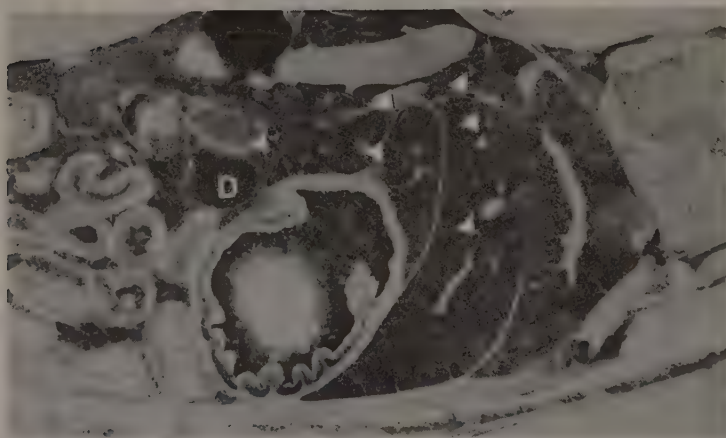
Abb. 3.1.1.5

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 270 Min. nach intravenöser Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 5,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, N = Niere, F = Fett, M = Muskel, D = Darm (Die Höhe des ausgezogenen Feldes gibt die Gesamtradioaktivität im Dünndarm (Ileum), die der gepunkteten Felder diejenige im Dickdarm (Colon) bzw. Blinddarm (Caecum) an.)



a



b

Abb. 3.1.1.6

Ausschnittsvergrößerung aus einem Rattenlängsschnitt (a) 30 Min. nach i. v.-Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl und zugehöriger Röntgenfilm (b). Deutlich ist die Anreicherung radioaktiv markierter Substanz in den Gallengängen (◀) und im Duodenum (D) zu erkennen.

270 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.1.5)

Nur mehr im Darmtrakt ist Radioaktivität vorhanden. Die Leber ist kaum noch zu erkennen; Mageninhalt und Niere nur noch schwach markiert. Die Meßergebnisse der Gesamtradioaktivitätsbestimmung zeigen, daß die größte Menge radioaktiver Substanz mit dem Dünndarminhalt inzwischen in den Kolon und den Caecum (Blinddarm) weitertransportiert wurde.

3.1.2 Verteilung nach intragastraler Gabe von (³H-Phenethyl)-Fentanyl

Autoradiographien nach i. v.-Gabe von Fentanyl zeigen eine deutliche Sequestrierung in den Magen. Um Anhaltspunkte für eine mögliche Rückresorption im Dünndarm zu erhalten, wurde die gleiche Fentanyl-Dosis wie bei den intravenös behandelten Ratten über eine Schlundsonde in den Magen appliziert.

Die Autoradiographie des Längsschnitts dieser Ratte (Abb. 3.1.2) zeigt hohe Aktivität im Vor- und Drüsenmagen, im Dünndarm und im Caecum. Die Leber ist bis auf wenige Stellen gleichmäßig markiert, wobei die Schwärzung weit geringer ist als im Gastrointestinaltrakt. Alle anderen Organe enthalten keine nennenswerten Mengen radioaktiven Materials.

Der größte Teil der Aktivität verbleibt demnach im GI-Trakt. Nur geringe Mengen Aktivität gelangen in die anderen Organe, wobei in der Leber der größte Teil der resorbierten Radioaktivität enthalten ist.

3.1.3 Verteilung nach i. v.-Applikation von (¹⁴C-Anilino)-Fentanyl

Aus Gründen, die weiter unten (vgl. Kapitel 4) diskutiert werden, wurde die Ganzkörperautoradiographie mit im Anilinring markiertem ¹⁴C-Fentanyl wiederholt. Mengenmäßig wurde die gleiche Dosis von 6 µg/100 g Körpergewicht (KG)

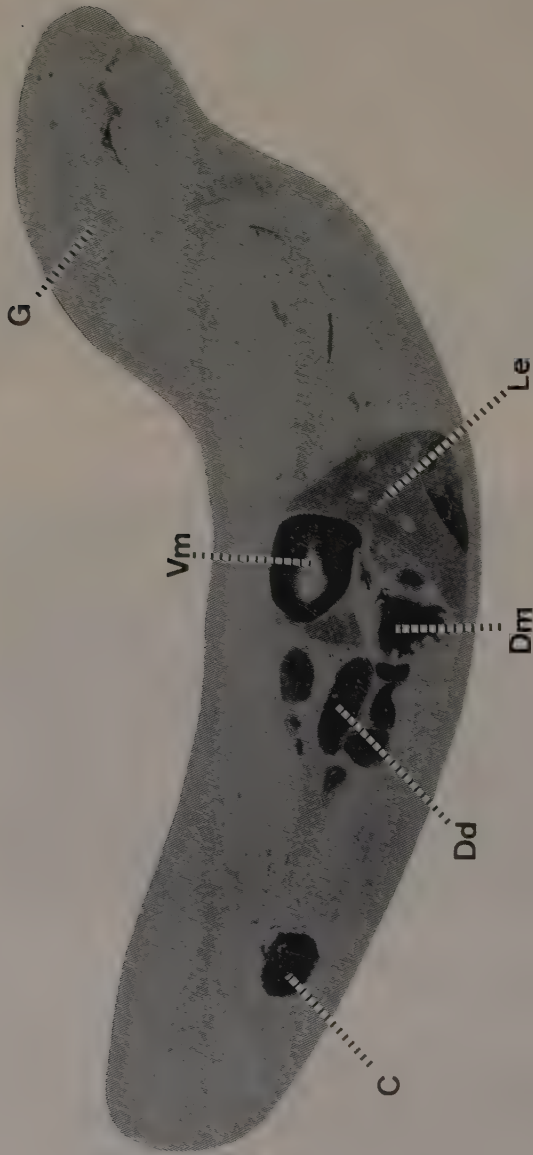


Abb. 3.1.2
Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 300 Min. nach intragastraler
Applikation von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} \pm$
 $5.96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) mittels Schlundsonde.
G = Gehirn, Le = Leber, Vm = Vormagen, Dm = Drüsenmagen, Dd =
Dünndarm, C = Caecum

appliziert, wobei die Aktivität 1,82 $\mu\text{Ci}/100 \text{ g KG}$ betrug. Durch die um den Faktor 10 höhere Energie der β -Strahlung von ^{14}C im Vergleich zu ^3H ($^3\text{H}:0,02 \text{ MeV}$, $^{14}\text{C}:0,2 \text{ MeV}$) ist die Auflösung der Autoradiographien besser. Auch die schwach markierten Gewebe, die bei Tritium nur zu einem diffusen Hintergrund führen, werden bei ^{14}C -Markierung kontrastreich dargestellt.

Sofort nach Injektionsende (Abb. 3.1.3.1)

Auffallend ist wiederum die starke Anreicherung von radioaktiver Substanz in Gehirn, Lunge und Myokard. Im Gehirn ist auch hier die graue Substanz stärker markiert als die weiße Substanz. Die Medulla oblongata zeigt im Zentralteil geringere Schwärzung als im Bereich des 4. Ventrikels. Anreicherung ist auch im Hypothalamus, in der Hypophyse sowie in den Corpora quadrigemina zu beobachten (vgl. Abb. 3.1.3.6). Die Alveolarstrukturen der Lunge sind deutlich zu erkennen, während die Bronchien leer sind. Das Myokard erscheint einheitlich dicht markiert. Auffällig ist die fleckige Struktur der Leber und die Schwärzung im Bereich der Nierenrinde und an der Schleimhaut von Magen und Dünndarm. Die gemessene Organaktivität zeigt in den gutdurchbluteten Organen (Herz, Lunge, Niere) überraschend hohe Werte, die eventuell auf nicht genügendes Ausbluten des Versuchstieres zurückzuführen sind.

10 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.3.2)

Das Gehirn zeigt nur mehr geringe Schwärzung im Bereich des Cerebrums. In der Lunge ist noch ein beträchtlicher Teil radioaktiver Substanz gebunden. Die Niere enthält ebenfalls viel Aktivität. Ursache für die Markierung im Bereich der Magenwand und des Mageninhalts ist die einsetzende Sequestrierung basischer radioaktiver Substanz in das Magenlumen.

30 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.3.3)

Im Gehirn findet sich fast keine radioaktive Substanz mehr. Die Umverteilung in den Magen-Darm-Trakt und die Niere ist deutlich zu erkennen. Die Leber ist einheitlich

markiert. Im Mageninhalt reichert sich weiter Aktivität an. Der Dünndarm erscheint bei diesem Tier noch weitgehend unmarkiert, was auf die individuelle Varianz im Gallenfluß zurückzuführen sein kann. Das Diagramm mit den Radioaktivitätswerten bestätigt auch hier die Zunahme der radioaktiven Substanzen in den exkretorischen Organen.

90 Minuten nach Injektionsende (Abb. 3.1.3.4)

Das Gehirn ist wegen der deutlich geringeren Schwärzung als im umgebenden Gewebe deutlich zu erkennen. Am auffälligsten ist die Anreicherung im Magen, Darm und Niere. Deutlich treten die Gallengänge in der sonst gleichmäßig markierten Leber hervor. Die Speicheldrüsen zeigen punktuelle Schwärzung, wodurch die Drüsenstruktur deutlich sichtbar wird. Das Mesenterial- und Subcutanfett ist schemenhaft zu erkennen. Die quantitative Bestimmung der Organaktivitäten bestätigt die Ergebnisse der Bildauswertung.

270 Minuten nach Injektion (Abb. 3.1.3.5)

Wie auch das Diagramm der Gesamtorganaktivität zeigt, hat sich der größte Teil des markierten Materials im Dünndarm angereichert. In Leber und Nierenbecken findet sich auch noch eine geringe Menge Radioaktivität. Die deutliche Schwärzung im Bereich des Mageninhalts deutet auf anhaltende Sequestrierung basischer Substanzen hin. Bemerkenswert ist die immer noch vorhandene intensive Anreicherung in der Speicheldrüse.

Vergleich der beiden i. v.-Autoradiographieserien

Die beiden Serien zeigen nur geringe qualitative Unterschiede in der Verteilung von ^3H -markiertem zu ^{14}C -markiertem Fentanyl, deren Ursachen überwiegend in der individuellen Variabilität der Versuchstiere liegen dürfte. Deutlich ist bei beiden Versuchsreihen ein sehr schnelles Anfluten von Aktivität in Gehirn, Lunge und Myokard zu sehen, gefolgt von einer ebenso raschen Umverteilung aus dem Gehirn in Leber, Magen und Niere. Es ist nicht auszuschließen, daß in den Dünndarm neben der Aktivität, die vom Magen aus hineingelangt, auch mit der

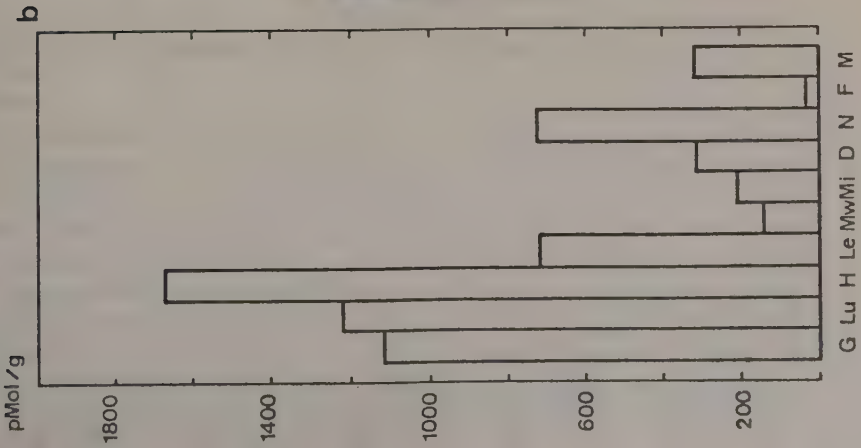


Abb. 3.1.3.1

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts **sofort** noch intravenöser
 Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl ($1,82 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz
 pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Magen-
 inhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

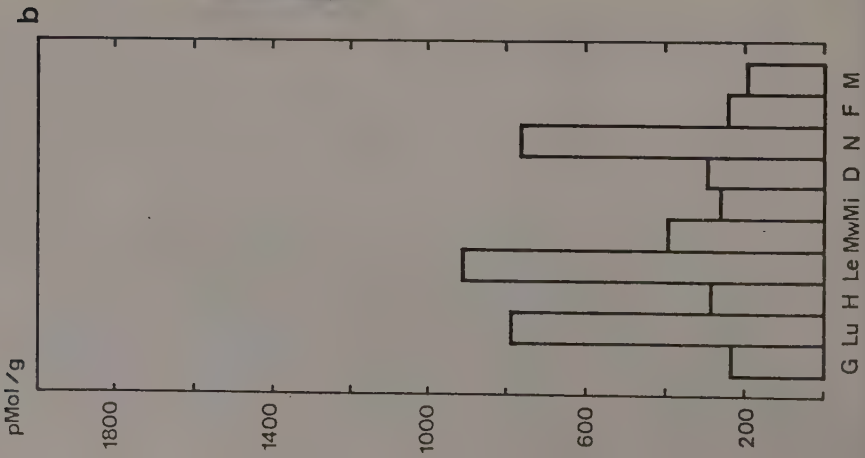


Abb. 3.1.3.2

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 10 Min. noch intravenöser Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl ($1,82 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

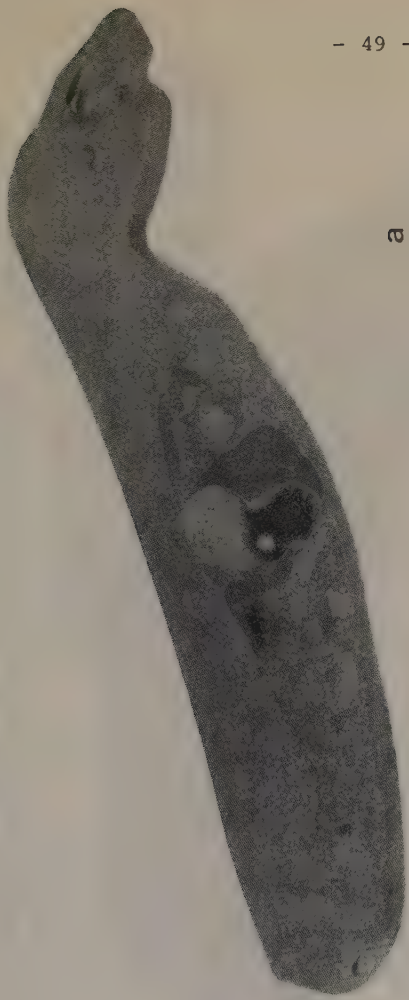
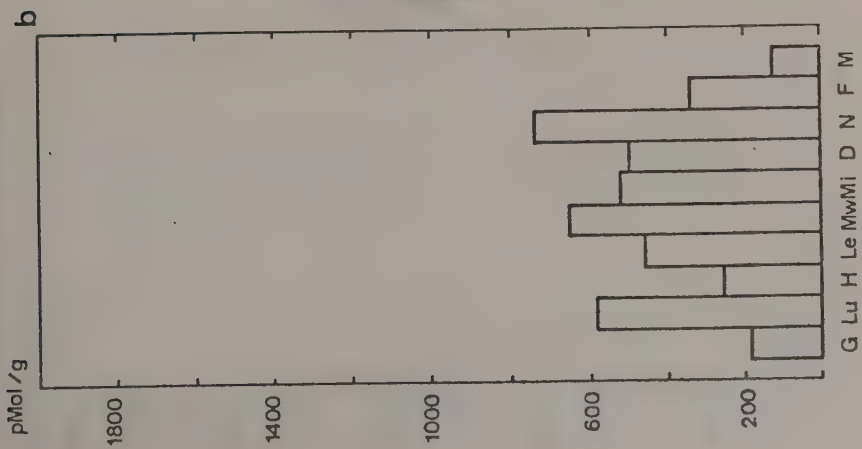


Abb. 3.1.3.3

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 30 Min. nach intravenöser Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl ($1,82 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

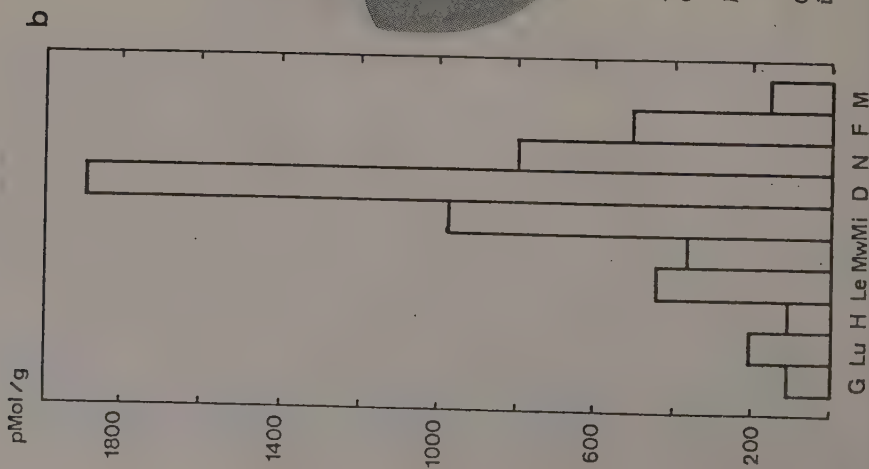
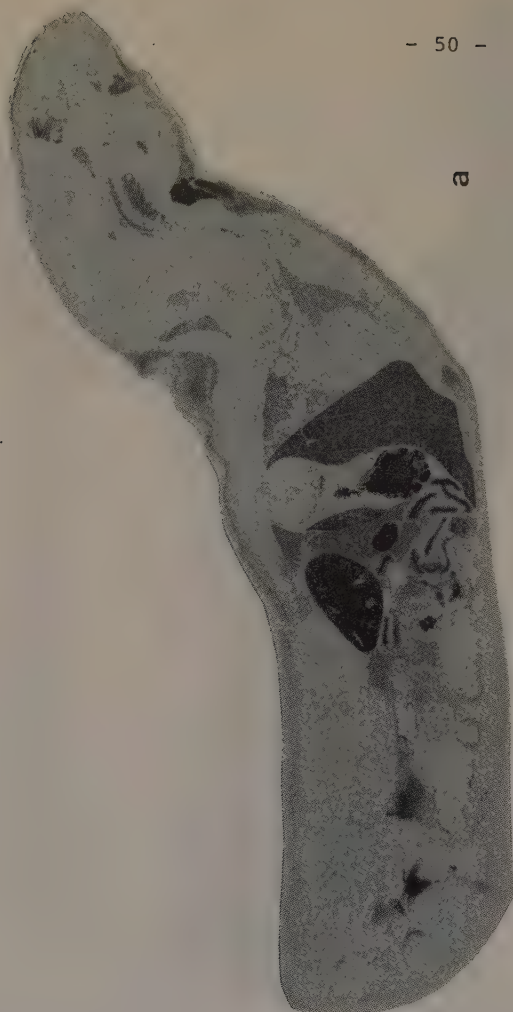


Abb. 3.1.3.4

- a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 90 Min. noch intravenöser Infektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl ($1,82 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel



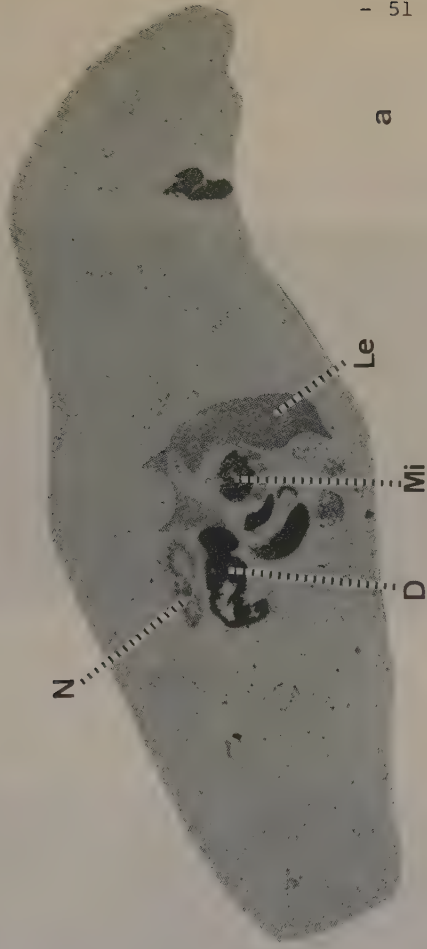
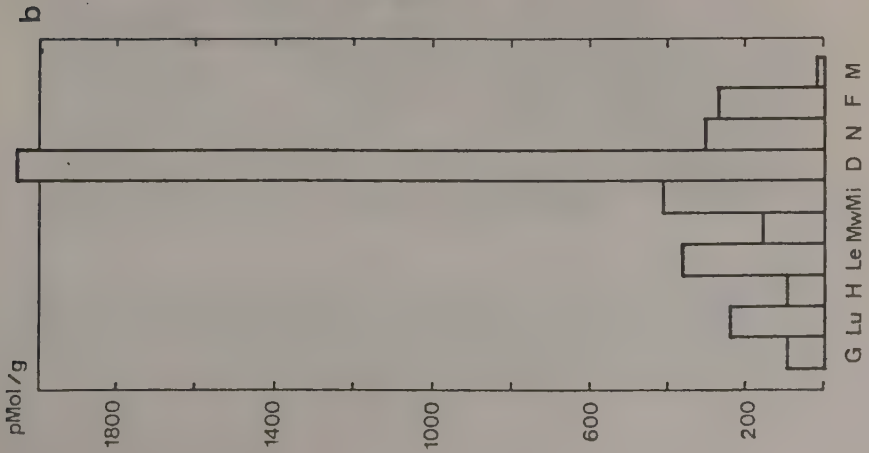


Abb. 3.1.3.5

a) Autoradiographie eines Rattenlängsschnitts 270 Min. nach intravenöser Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl ($1,82 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} = 6 \mu\text{g}/100 \text{ g}$)
 b) Gesamtradioaktivität der Organe ausgedrückt in pMol radioaktiver Substanz pro Gramm Organengewicht.

G = Gehirn, Lu = Lunge, H = Herz, Le = Leber, Mw = Magenwand, Mi = Mageninhalt, D = Dünndarm, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

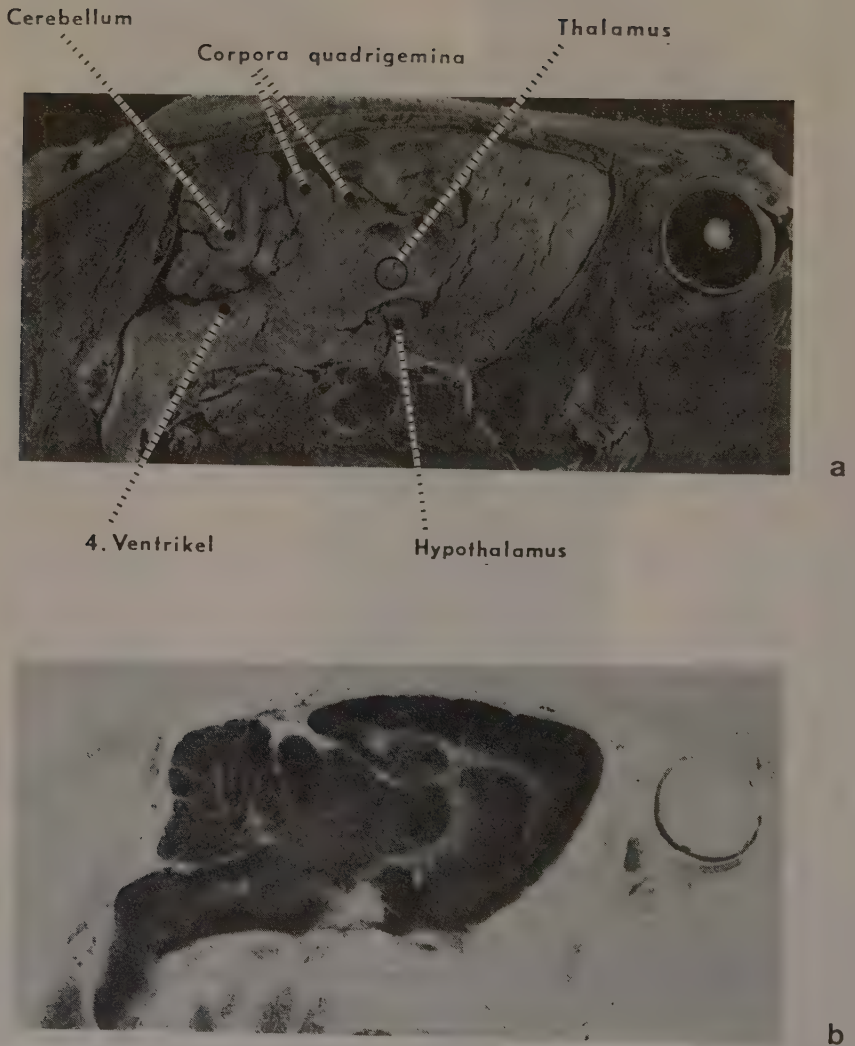


Abb. 3.1.3.6

Ausschnittsvergrößerung aus einem Rattenlängsschnitt (a) sofort nach i. v.-Injektion von $(^{14}\text{C}\text{-Anilino})\text{-Fentanyl}$ und zugehöriger Röntgenfilm (b), der die unterschiedliche Anreicherung radioaktiver Substanz in den einzelnen Gehirnregionen zeigt.

Galle eine größere Menge radioaktiv markierter Substanz sezerniert wird. Da durch die an unterschiedlichen Stellen im Fentanylmolekül sitzenden "Tracer" verschiedene radioaktive Metaboliten zu erwarten sind, zeigen vor allem Leber und Niere in den beiden Serien zeitlich und mengenmäßig unterschiedliche Organradioaktivität. Bei keinem der untersuchten Tiere ließen sich Anzeichen für einen Wiederanstieg der Aktivität im Gehirn finden.

3.2. Quantitative Organverteilung

3.2.1 Vergleich der Blutspiegelkurven nach intravenöser und intragastraler Verabreichung von ^3H -Fentanyl

Blutspiegelkurven nach intravenöser Gabe

Da Plasmawerte wegen der Erythrocytenbindung von Fentanyl (Bower 1982) nur etwa die Hälfte der tatsächlichen Konzentration ergeben, wurden die Messungen mit Vollblut vorgenommen. In Abb. 3.2.1 sind die Konzentrationsverläufe von ^3H -Fentanyl und Gesamtradioaktivität im Vollblut nach i. v.-Gabe von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl graphisch dargestellt. Die Fentanylkurve zeigt einen sehr raschen Abfall in den ersten Minuten (α -Phase) mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Minute, gefolgt von einem langsamen Abfall (β -Phase) mit einer Halbwertszeit von ca. 60 Minuten. Die Kurve der Totalaktivität, die die Summe der Aktivität von Fentanyl und radioaktiven Metaboliten wiedergibt, erreicht zwischen 10 und 30 Min. nach Injektionsende ein Maximum und fällt dann etwa parallel zur Fentanylkurve ab. Im Blut befinden sich in der β -Phase immer etwa 3mal mehr Metaboliten als Fentanyl.

Blutspiegelkurven nach intragastraler Gabe

Um Daten über die Bioverfügbarkeit von im Dünndarm resorbiertem Fentanyl zu erhalten, wurde die gleiche Dosis wie bei i. v.-Applikation einer Ratte intragastral verabreicht und anschließend die Blutspiegelkurven aufgenommen, die in Abb. 3.2.2 wiedergegeben sind. 20 Minuten

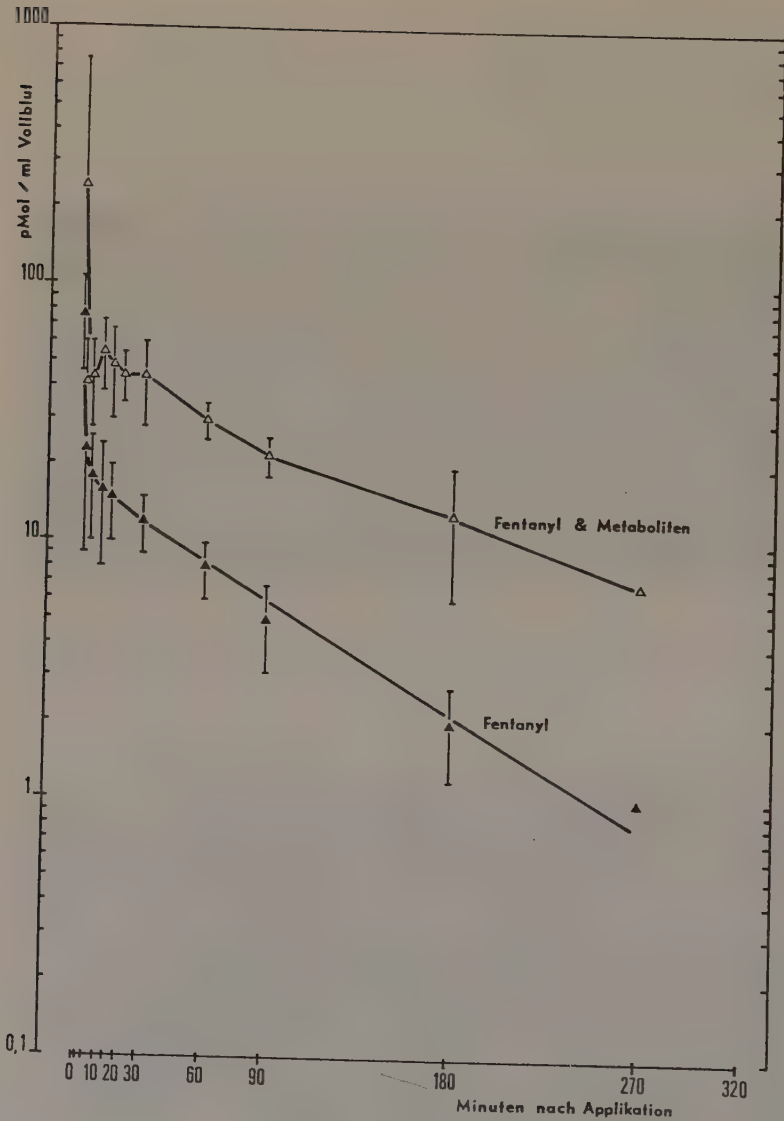


Abb. 3.2.1.1

Blutspiegelkurven von Fentanyl und Metaboliten nach i. v.-Gabe von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung ($n = 4$ bis 15). Für den Zeitpunkt 270 Min. liegen nur 2 Meßwerte vor.

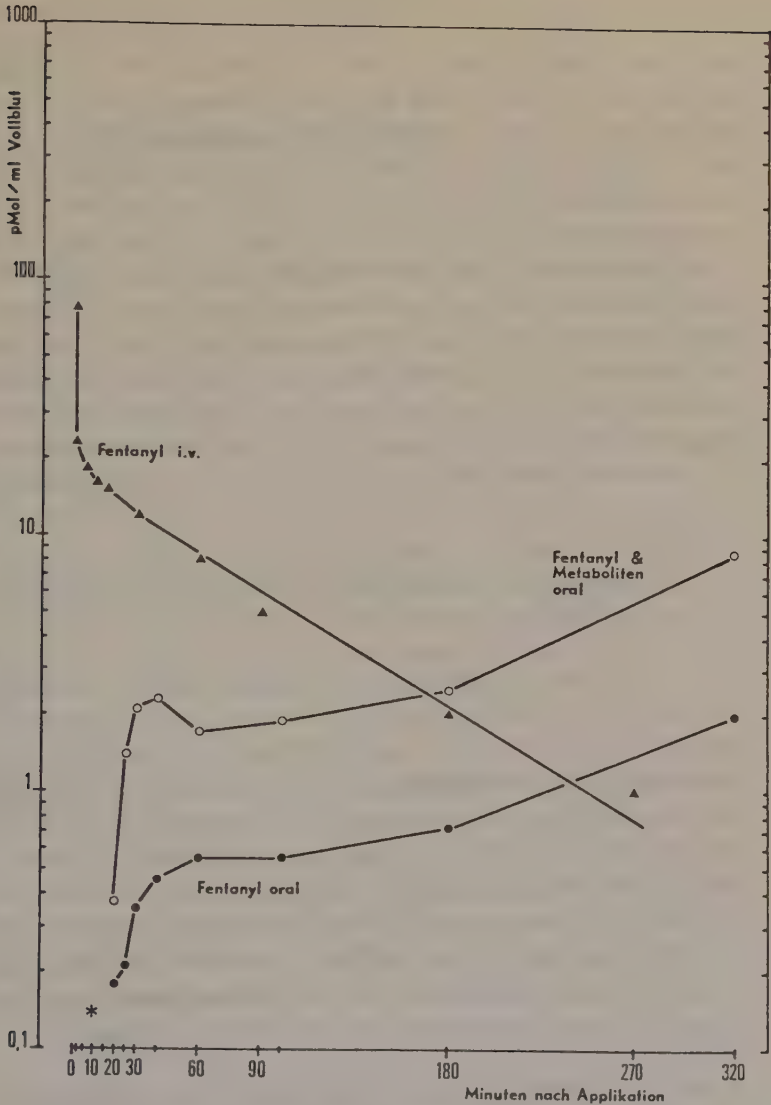


Abb. 3.2.1.2

Blutspiegelkurven nach intragastraler Gabe von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ($300 \mu\text{Ci}/100 \text{ g} \hat{=} 5,96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) im Vergleich mit der Fentanylspiegelkurve nach i. v.-Injektion. Die Fentanylwerte entsprechen der bei pH-8 mit Hexan extrahierbaren Radioaktivität, während die Kurve "Fentanyl und Metaboliten" der Gesamtradioaktivität entspricht. Bei * wurde dem Versuchstier in Äthernarkose der Venenkatheter für die Blutentnahme gelegt (Dauer 20 Min.).

nach Gabe von ^3H -Fentanyl über eine Schlundsonde stiegen sowohl die Fentanyl- als auch die Gesamtradioaktivitätswerte steil an, blieben aber weit unterhalb der Werte nach intravenöser Gabe. Deutlich erkennbar war der überschießende Anstieg der auf hydrophilen Metaboliten beruhenden Gesamtradioaktivität. Danach erfolgte ein deutlich langsamerer, aber kontinuierlicher Anstieg beider Kurven während des Untersuchungszeitraums von 5 Stunden, wobei die Gesamtradioaktivität immer etwa 4mal höher lag als die Fentanylkonzentration. Der planimetrische Flächenvergleich der Fentanylkurven nach intravenöser und intragastraler Applikation ergab für die ersten 270 Minuten eine Bioverfügbarkeit von 1,5 % (Fläche oral zu Fläche i. v. = $1298:87169 \text{ pMol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{Min.}$).

3.2.2 Radiochromatographische Analyse des Metabolitenmusters der Organe

Da Ganzkörperautoradiographien nur die Verteilung der Gesamtaktivität wiedergeben und andererseits der Vergleich der Blutspiegel von Fentanyl und Totalaktivität auf eine rasch einsetzende Metabolisierung schließen ließ, wurde zunächst das Metabolitenmuster von ^3H -Fentanyl in den Organen sofort 10 Min., 30 Min., 90 Min. und 270 Min. nach Injektionsende radiochromatographisch analysiert. Das für diese Untersuchungen verfügbare ^3H -Fentanyl trägt den Tritiummarker in der Phenethylseitenkette, die durch oxidative N-Dealkylierung, den wichtigsten Abbauweg von Fentanyl, als hydrophiler Säuremetabolit abgespalten wird.

Um die Verteilung und den Metabolismus des Grundgerüsts weiter zu verfolgen, wurden die radiochromatographischen Organanalysen nach intravenöser Gabe von selbstsynthetisiertem ^{14}C -Fentanyl wiederholt.

3.2.2.1 Identifizierung der basischen Metaboliten von Fentanyl

Wie in Abbildung 3.2.2 a an einem Beispiel gezeigt, werden nach ^3H -Fentanylapplikation in der Leber mindestens 5 radioaktiv markierte Metaboliten gebildet. Die Auftrennung von Organextrakten nach ^{14}C -Fentanylinjektion ergab ein ähnliches Metabolitenmuster (Abb. 3.2.2 b). Da aber die beiden Marker an unterschiedlichen Stellen im Molekül liegen, sollten eigentlich unterschiedliche Metaboliten zu erwarten sein.

Zur Identifikation der Peaks auf den Dünnschichtplatten wurden zusätzlich Vergleichssubstanzen aufgetragen und im Laufmittelsystem A (vgl. Kapitel 2.4.2) aufgetrennt. Durch Zuordnung der Vergleichssubstanzen wurde der Nachweis der in Tabelle 3.2.2.1 aufgeführten Metaboliten erbracht.

Tabelle 3.2.2.1

Übersicht der auf den Dünnschichtchromatogrammen nachweisbaren Metaboliten

hR _f -Wert	Vergleichssubstanz	
0-10	Phenylelessigsäure Mandelsäure	nur bei ^3H -Fentanyl
5	Anilinopiperidin	nur bei ^{14}C -Fentanyl
15	Nor-Fentanyl	nur bei ^{14}C -Fentanyl
15	nicht identifizierbar	nur bei ^3H -Fentanyl
35	(p-Hydroxy-Phenethyl)- Fentanyl	
42	nicht identifizierbar	
55-80	Despropionyl-Fentanyl N-(1-Methyl-4-piperidyl)- propionanilid α -Hydroxy-Fentanyl Fentanyl	

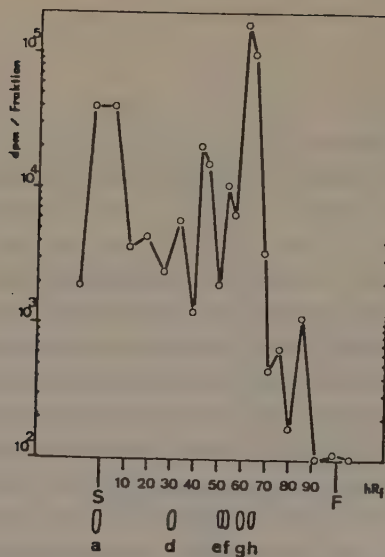


Abb. 3.2.2. a)
Dünnschichtchromatographische Auftrennung einer Leberprobe 30 Min.
nach i. v.-Gabe von ^3H -Fentanyl. Laufmittelsystem A. Auswertung
durch streifenförmiges Abkratzen der Fraktionen und Flüssigszin-
tillationszählung.

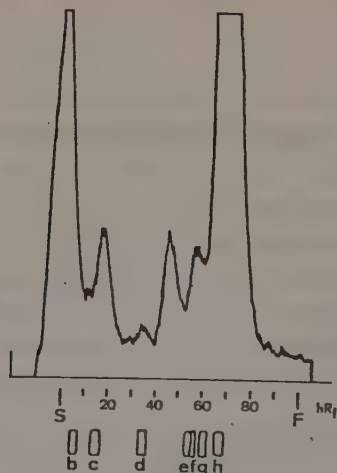


Abb. 3.2.2. b)
Dünnschichtchromatographische Auftrennung einer Magenwandprobe
90 Min. nach i. v.-Gabe von ^{14}C -Fentanyl. Laufmittelsystem A.
Auswertung mittels BERTHOLD Dünnschichtscanner.

Vergleichssubstanzen: a = Phenylelessigsäure, Mändelsäure
b = Anilinopiperidin
c = Nor-Fentanyl
d = (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl
e = N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid
f = Despropionyl-Fentanyl
g = α -Hydroxy-Fentanyl
h = Fentanyl

Die Strukturformeln und die vermuteten Bildungswege dieser Metaboliten sind in Abb. 4.5 wiedergegeben. Um die Identifizierungswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurden eine Organprobe und die Vergleichssubstanzen in einem weiteren, von Lehmann (1981) beschriebenen Laufmittelsystem getrennt. Dabei änderte sich nichts an der qualitativen und quantitativen Zuordnung des Metabolitenmusters zu den Vergleichssubstanzen. Moffat (1974) gibt bei Verwendung von 2 verschiedenen Laufmittelsystemen zur Dünnschichtchromatographie als Maß für die Richtigkeit der Identifizierung einen "discriminating power" genannten Wert von 0,94 an, wobei der Wert 1,0 absolute Identifizierung bedeuten würde. Bei den in der Nähe des Auftragspunkts verbleibenden Metaboliten des ^3H -Phenethyl-Fentanyl handelt es sich um die aus der Phenethylseitenkette entstehenden Säuren (vgl. dazu Kapitel 3.2.2.2). Nach Gabe von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl entspricht die in diesem hR_f -Wertbereich nachzuweisende Radioaktivität dem Anilinopiperidin. Bei Verwendung von ^3H -Fentanyl tritt mit einem hR_f -Wert von 15 ein Peak auf, dem keine Vergleichssubstanz zugeordnet werden konnte. Auf dem ^{14}C -Chromatogramm ist der Nachweis dieses Metaboliten nicht zu erbringen, da er durch Nor-Fentanyl überlagert wird. Da die Metaboliten mit hR_f 35 und 42 in den Extrakten beider "Tracer" nachzuweisen sind, muß es sich dabei um Verbindungen mit intaktem Grundgerüst und Phenethylseitenkette handeln. Der Metabolit mit hR_f 35 läßt sich als (p-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl identifizieren. Die Umsetzung des von der DC-Platte extrahierten Metaboliten hR_f 42 mit Benzoylchlorid führt zu einem unpolaren Derivat, was auf reaktionsfähige Hydroxylgruppen im Molekül hindeutet. Es könnte sich um (p-Hydroxy-anilino)-Fentanyl handeln, dessen Identifizierung wegen fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich ist. Die experimentellen Daten würden dieser Annahme nicht widersprechen (vgl. Kapitel 4: Diskussion). Da im Bereich der hR_f -Werte 55-80 mehrere

Vergleichssubstanzen nahe beieinander liegen und die Auswertung des Organextrakts in diesem Bereich einen breiten bzw. mehrere nicht aufgelöste Peaks zeigte, wurde diese Fraktion abgekratzzt, mit Benzoylchlorid derivatisiert und im Laufmittelsystem C (vgl. Kapitel 2.4.4)erneut aufgetrennt. Die entsprechenden Vergleichssubstanzen wurden ebenfalls derivatisiert. Durch diese Umsetzreaktion wurde nur das chromatographische Verhalten von α -Hydroxy-Fentanyl, nicht jedoch das von Fentanyl, Despropionyl-Fentanyl und N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid verändert. Das Chromatogramm in Abb. 3.2.2.3 zeigt die Auswertung der Auftrennung einer derivatisierten Dünndarm-Fentanylfraktion.

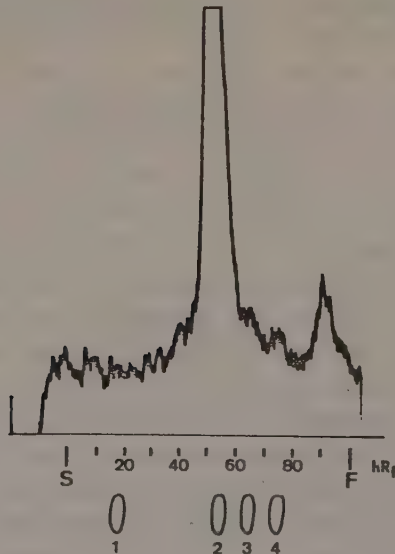


Abb. 3.2.2. c)

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der mit Benzoylchlorid derivatisierten Fentanylfraktion einer Dünndarmprobe 10 Min. nach i. v.-Gabe von ^{14}C -Fentanyl. Laufmittelsystem C. Auswertung mittels Radiodünnschichtscanner.

Vergleichssubstanzen: Benzoylderivate von:

- 1 = N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid
- 2 = Fentanyl
- 3 = Despropionyl-Fentanyl
- 4 = α -Hydroxy-Fentanyl

Fentanyl, Despropionyl-Fentanyl und α -Hydroxy-Fentanyl sind zu identifizieren. N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid läßt sich nicht eindeutig nachweisen. Dafür tritt im Bereich des hR_f -Wertes 92 ein nicht identifizierbarer Metabolit auf, der durch die Umsetzung mit Benzoylchlorid ein unpolares Derivat bildet und folglich reaktionsfähige Hydroxylgruppen im Molekül enthalten muß. Zudem besitzt er das Fentanyl-Grundgerüst und die Phenethylseitenkette, da er sowohl aus ^{14}C - als auch aus 3H -Fentanyl entsteht. Bei Betrachtung der relativen Mengen an OH-Verbindungen fällt auf, daß mehr (4-Hydroxy-anilino)-Fentanyl (hR_f 42) als (4-Hydroxy-PE)-Fentanyl gebildet wird. α -Hydroxy-Fentanyl tritt dagegen nur in weit geringeren Konzentrationen auf.

3.2.2.2. Identifizierung der sauren Metaboliten und ihrer Konjugate in Niere, Leber und Dünndarm

Die Auftrennung der Säurefraktion, in der sich die Oxidationsprodukte der metabolisch abgespaltenen Phenethylseitenkette finden, sollte Rückschlüsse auf mögliche Intermediärprodukte mit intaktem Fentanylgrundkörper zulassen. Da diese Säurefraktion in Niere, Leber und Dünndarm 30 Minuten nach Injektion von (3H -Phenethyl)-Fentanyl einen beträchtlichen Anteil an der Gesamtradioaktivität hat, wurden die weiteren Untersuchungen damit durchgeführt. Von den Phenylalkylsäuren ist bekannt, daß sie in der sog. Phase II des Metabolismus mit körpereigenen hydrophilen Molekülen gekoppelt werden (James 1972). Es galt, auch diese sog. Konjugate durch Spaltung nachzuweisen. Zunächst wurden die entsprechenden Stellen der DC-Platten aus der Basenanalyse eluiert und das Eluat in einem sauren Laufmittel erneut getrennt. Die Auswertung ergab für Nierenproben von 4 Tieren die in Tabelle 3.2.2.2.1 wiedergegebenen Werte.

Tabelle 3.2.2.2.1

Saure Metaboliten von Nierenproben (4 Tiere) 30 Min. nach Injektion von ^3H -(Phenethyl)-Fentanyl. Auftrennung von Eluaten der Säurefraktion von den DC-Platten der Basenanalyse (dem hR_f -Wert von 55-70 entspricht Phenylelessigsäure).

hR_f	% - Anteil an Säurefraktion			
0-10	9,6	10,6	10	13,5
10-35	75	79,6	61	75,2
35-55	1,3	3,2	1,7	0,8
55-70	14	6,6	25	10,5

Für weitere Untersuchungen auf mögliche Konjugate waren die von den DC-Platten der Basenanalyse zu gewinnenden Substanzmengen zu gering, weshalb die direkte Extraktion von angesäuerten Nierenhomogenantenn versucht wurde.

Tabelle 3.2.2.2.2 gibt die dabei gewonnenen Werte wieder.

Tabelle 3.2.2.2.2

Saure Metaboliten einer Nierenprobe (30 Min. p. i.). Auftrennung eines Extraktes des angesäuerten Gewebhomogenats

hR_f	% - Anteil an Säurefraktion
0-10	3
10-35	76
35-55	10
55-70	10,5

Wegen der guten Konkordanz dieser Werte mit denen aus Tabelle 3.3.4.1 konnten die Konjugattests mit diesen Extrakten durchgeführt werden. Eine weitere dieser sauer extrahierten Proben wurde mit Glucuronidase/Sulfatase behandelt, um Glucuronsäure- und Sulfatkonjugate zu spalten. Nach dieser Behandlung hatte sich das Muster der Säuremetaboliten nicht geändert, d. h. es traten keine Glucuronid- und Sulfatkonjugate auf. Ein dritter Säureextrakt wurde 30 Minuten mit Perchlorsäure gekocht, woraus das in Tabelle 3.2.2.2.3 und Abb. 3.2.2.2 a) dargestellte Säuremuster resultierte.

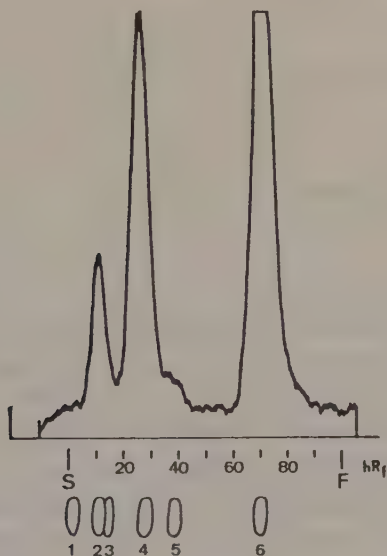


Abb. 3.2.2.2.1

Dünnschichtchromatographische Auftrennung der sauren Metaboliten eines mit Perchlorsäure behandelten Nierenextrakts (30 Min. nach Injektion von ^3H -Fentanyl). Laufmittelsystem B.

Vergleichssubstanzen: 1 = 3,4-Dihydroxy-mandelsäure

2 = 4-Hydroxy-mandelsäure

3 = 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure

4 = Mandelsäure

5 = 4-Hydroxy-phenylelessigsäure

6 = Phenylelessigsäure

Tabelle 3.2.2.2.3

Saure Metaboliten einer Nierenprobe (30 Min. p. i.). Organextrakt mit Perchlorsäure gekocht.

Vergleichs- substanz	hR _f	%-Anteil an Säurefraktion
	0-10	2
p-OH-Mandelsäure	10-20	10
Mandelsäure	20-30	28
p-OH-Phenylessig- säure	30-40	3
Konjugat	40-55	-
Phenylessigsäure	55-70	57

Offensichtlich hat eine Spaltung von nur durch HClO₄ spaltbaren Konjugaten stattgefunden. Als saure Metaboliten der Phenethylseitenkette treten neben der Phenylessigsäure auch Mandelsäure und die p-Hydroxy- und evtl. auch Dihydroxyverbindungen dieser Säuren auf. In gleicher Weise wie die Niere wurden auch Leber und Dünndarm untersucht, da Säuren auch als Glucuronide mit der Galle in den Dünndarm sezerniert werden können. Die chromatographische Auftrennung der unbehandelten Säurefraktion von Leber und Dünndarm ist in Tabelle 3.2.2.2.4 aufgelistet. In diesem Konjugatsspaltungstest blieb das Säuremuster der Leberextrakte unverändert. Dagegen kam es bei den Extrakten des Dünndarms sowohl durch Behandlung mit Perchlorsäure als auch mit Glucuronidase/Sulfatase zur Konjugatsspaltung, wobei beide Verfahren annähernd gleiche Werte lieferten (Tabelle 3.2.2.2.5).

Tabelle 3.2.2.2.4

*Auftrennung der Eluate von Säurefraktionen von Leber und Dünndarm
30 Min. p. i.*

hR _f	%Anteil an Säurefraktion	
	Leber	Dünndarm
0-20	81,5	99
20-35	9,8	1
35-45	2,7	-
45-70	6	1

Tabelle 3.2.2.2.5

*Auftrennung der Säurefraktion von Dünndarmproben (30 Min. p. i.)
nach HClO₄-bzw. Enzymbehandlung*

Substanz	hR _f	%Anteil an Säurefraktion	
		nach HClO ₄ - Behandlung	nach Enzym- behandlung
Mandelsäure p-OH-Phenyl- essigsäure Phenylessig- säure	0-20	88,3	84,9
	20-35	3	6,2
	35-45	2,5	4,4
	45-70	6,2	4,5

Im Vergleich zur Niere fällt auf, daß in Leber und Dünndarm eine nicht durch Vergleichssubstanzen identifizierbare Substanz mit hR_f 0-20 als Hauptanteil der Säurefraktion auftritt und durch Konjugatspaltung in ihrem chromatographischen Verhalten nicht verändert wird.

Weitere Versuche, sie durch Kochen in Natronlauge zu verändern, zeigten ebenfalls keinen Erfolg. Auch die Derivatisierung mit Benzoylchlorid, ein Test auf freie OH-Gruppen, änderte nichts an den chromatographischen Eigenschaften der Substanz. Jedoch zeigte sie eine positive Dragendorff-Reaktion, was für das Verhandensein des Fentanylgrundgerüsts spricht.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in der Niere neben freier Phenylelessigsäure überwiegend Konjugate der Phenylelessigsäure, Mandelsäure und deren aromatische Hydroxylierungsprodukte auftreten. Die Ausscheidung von Säurekonjugaten mit der Galle in den Dünndarm scheint nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Sowohl in der Leber als auch im Dünndarm tritt ein nicht identifizierter Metabolit als hauptsächlicher Anteil der Säurefraktion auf.

3.2.2.3 Konzentrationsverläufe der Metaboliten nach i. v.-Gabe von (3H -Phenethyl)-Fentanyl

Durch quantitative Auswertung der Radiochromatogramme war es möglich, die Konzentrationsverläufe von Fentanyl und seinen Metaboliten in den einzelnen Organen zu bestimmen. Die zeitlichen Veränderungen im Metabolitenmuster sind für Gehirn, Leber, Mageninhalt, Darminhalt und Niere in Abb. 3.2.2.3.1-5 graphisch dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in den Abbildungen die Metaboliten zu Gruppen zusammengefaßt. Dabei wurde in der Gruppe "Hydroxylverbindungen" α -Hydroxy-Fentanyl und die Fraktionen mit hR_f 35 und 42 und in der Gruppe "nicht identifiziert" die unbekannte, derivatisierbare Substanz der Fentanylfraktion und die Fraktion mit hR_f 15 zusammen-

gefaßt. In der Gruppe "Säuren" finden sich die sauren Produkte der Phenethylseitenkettenabspaltung und in der Gruppe "Fentanyl" die unveränderte Ausgangssubstanz. Die genaue Aufschlüsselung des Metabolitenmusters dieser und weiterer Organe kann den Tabellen 3.2.2.3.1-9 entnommen werden. Bei Betrachtung der Metabolitenverteilung im Gehirn ist zu erkennen, daß kurz nach Injektion neben überwiegend lipophilem Fentanyl auch Hydroxylverbindungen und Säuren auftreten (Abb. 3.2.2.3.1). Die hydrophilen Verbindungen verlassen das Gehirn schneller wieder als das lipophile Fentanyl. Der Abfall der Fentanylkonzentration verläuft parallel zu den Blutspiegelwerten (vgl. Kapitel 3.2.1). In der Leber erreicht die Gesamtaktivität ihren höchsten Wert nach 30 Minuten (Abb. 3.2.2.3.2). Die im Vergleich zum Fentanyl langsamere Konzentrationsabnahme der Metaboliten spricht für kontinuierlichen Abbau des Fentanyls. Der Gehalt an Säuren erreicht nach 30 Minuten ein Maximum, während die Hydroxylverbindungen von 10 bis 90 Minuten gleichbleibende Konzentrationen zeigen. Im Mageninhalt kommt es zur Anreicherung von Aktivität, die nach 30 Minuten noch überwiegend von unverändertem Fentanyl herrührt (Abb. 3.2.2.3.3). Nach 90 Minuten stammt ca. 50 % der Aktivität von Metaboliten, die zu gleichen Teilen zu den Hydroxylverbindungen und den Säuren zu zählen sind. Zum Zeitpunkt 270 Min. p. i. hat sich der Magen wieder entleert. Die stärkste Ansammlung von Radioaktivität zeigt der Dünndarminhalt, die nach 90 Minuten ein Maximum erreicht (Abb. 3.2.2.3.4). Nach anfänglicher Fentanylanreicherung erfolgt nach 30 Minuten eine ausgeprägte Zufuhr von Säuren (vgl. dazu Kapitel 3.2.2.2). Weniger deutlich ist die Zunahme der Hydroxylverbindungen. Dagegen nimmt die Fentanylkonzentration laufend ab. Bemerkenswert ist die Konzentrierung von Fentanyl in der Niere bis 10 Minuten, gefolgt von einer langsamen, der Leber vergleichbaren Abnahme (Abb. 3.2.2.3.5). Die Säurefraktion und die OH-Verbindungen folgen in ihrem Konzentrationsgang dem der Leber,

Abb. 3.2.2.3.1-5

Zeitverläufe des Metabolitenmusters in Gehirn, Leber, Mageninhalt, Dünndarminhalt und Niere nach i. v.-Injektion von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl. Die Höhe der Säulen gibt die Gesamtradioaktivität an und die Höhe der gerasterten Felder den Anteil der Metaboliten. In den Diagrammen wurden die Metaboliten zu folgenden Gruppen zusammengefaßt:

-  Fentanyl
-  nicht identifiziert: hR_f 15, unidentifiziert (derivatisierbar)
-  Hydroxylverbindungen: (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl
 hR_f 42, α -Hydroxy-Fentanyl
-  Säuren

Die Strukturformeln der Metaboliten zeigt Abb. 4.5.

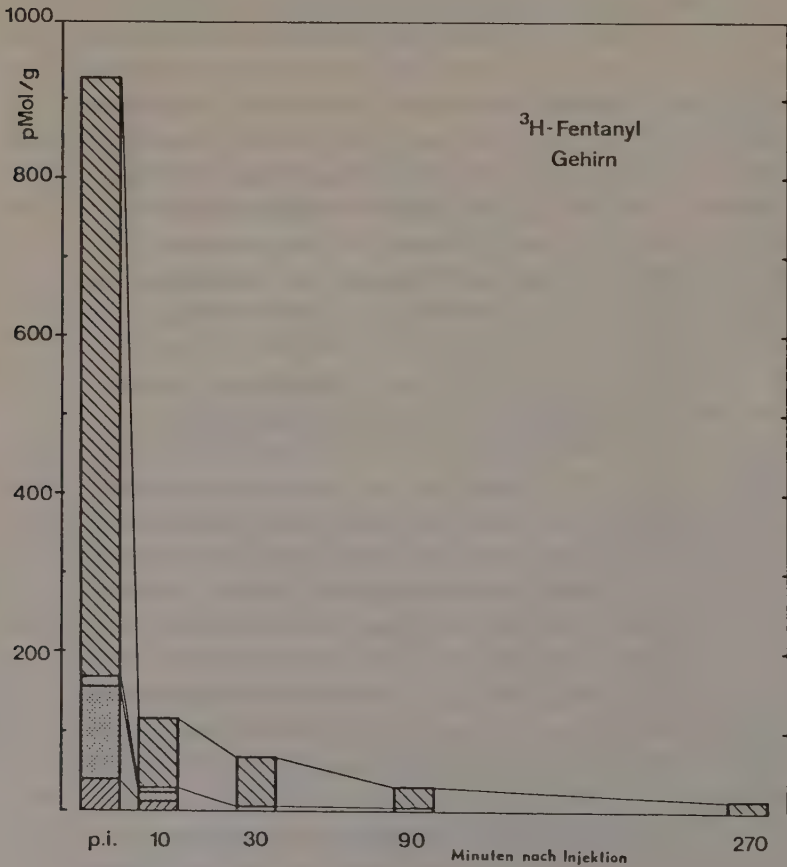


Abb. 3.2.2.3.1

Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Gehirn nach i. v.-Injektion von ^3H -Fentanyl

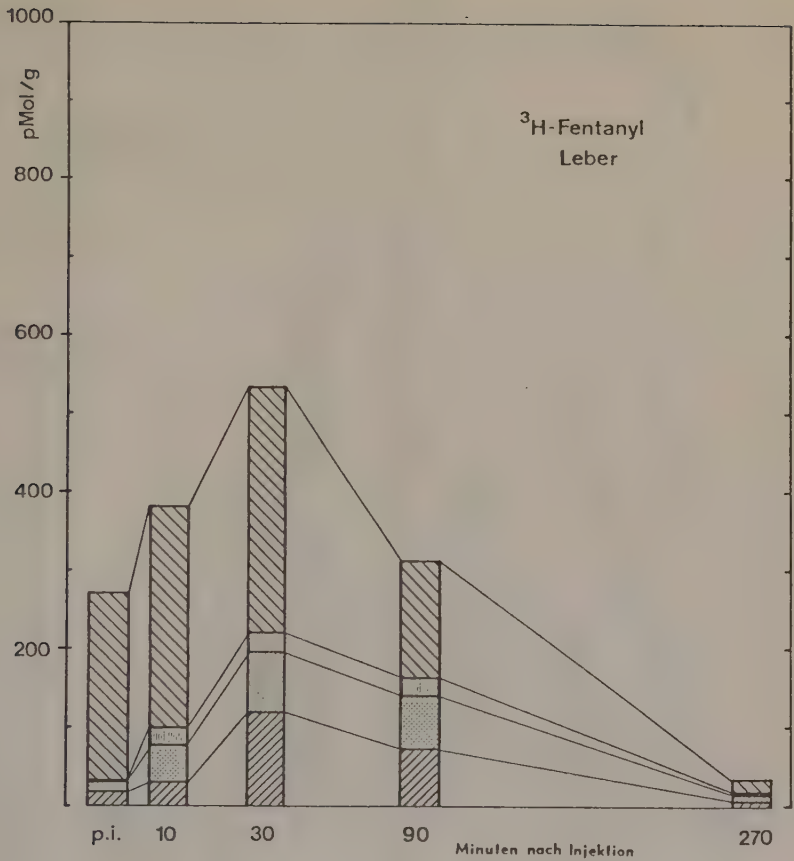


Abb. 3.2.2.3.2

Zeitverlauf des Metabolitenmusters in der Leber nach i. v.-Injektion von ³H-Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.3.1)

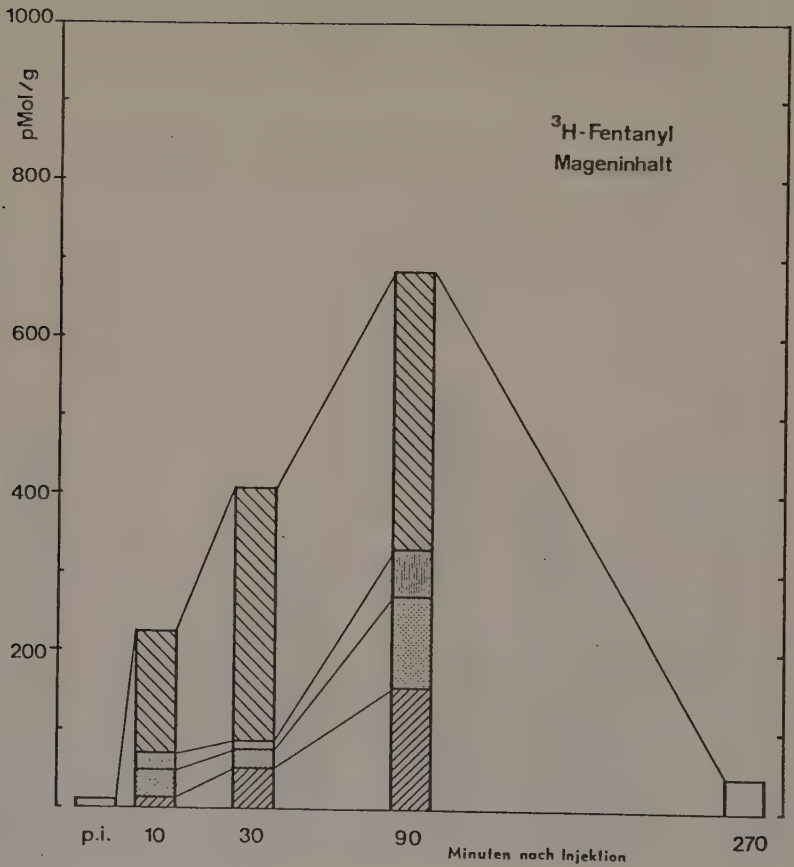


Abb. 3.2.2.3.3

Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Mageninhalt nach i. v.-Injektion von ³H-Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.3.1)

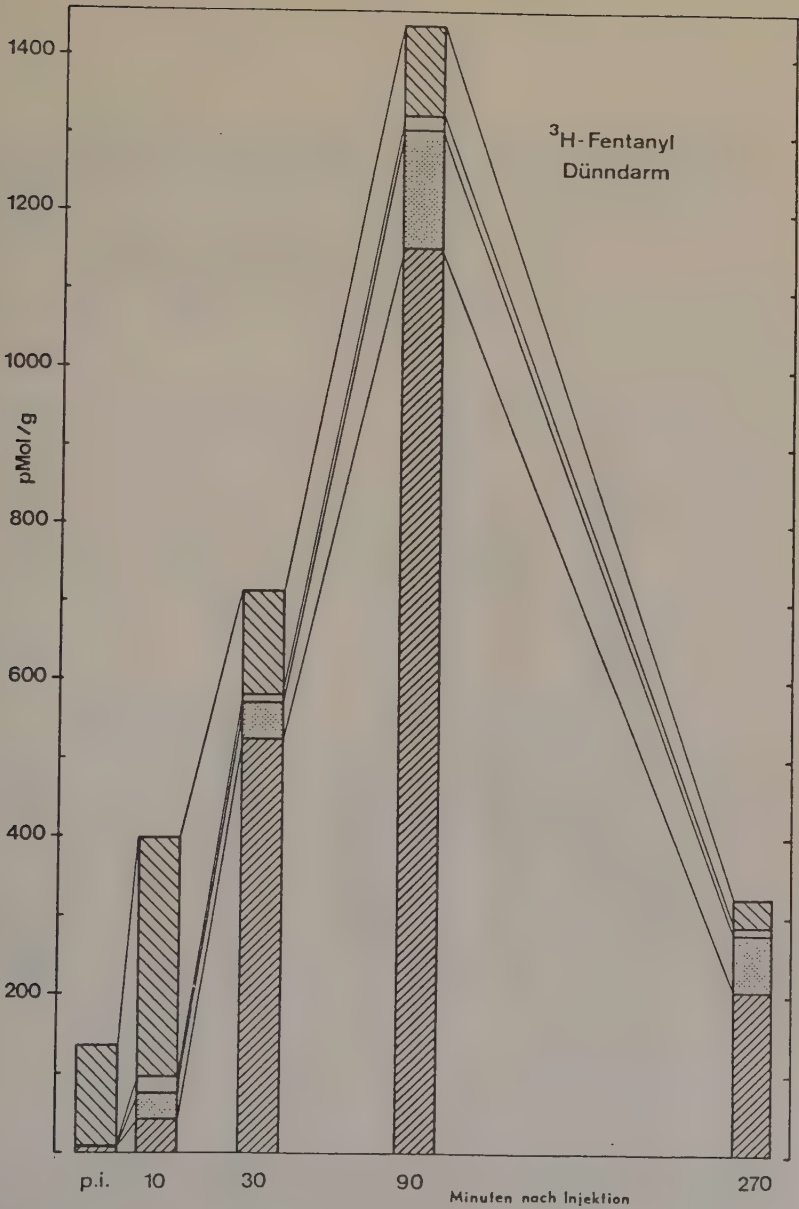


Abb. 3.2.2.3.4

Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Dünndarminhalt nach i. v.-Injektion von ^3H -Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.3.1)

Tabellen 3.2.2.3.1-9

Metabolitenmuster der Rattenorgane sofort, 10, 30, 90 und 270 Min. nach Injektion von 300 $\mu\text{Ci}/100 \text{ g}$ (^3H -Phenethyl)-Fentanyl. Angegeben ist die Gesamtradioaktivität und die Konzentration der Metaboliten in pMol/g Frischgewicht.

4-OH-PE-Fentanyl = (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl

4-OH-Anilino-Fentanyl = (4-Hydroxy-anilino)-Fentanyl

α -OH-Fentanyl = α -Hydroxy-Fentanyl

Die Strukturformeln der Metaboliten zeigt Abb. 4.5.

* Fentanylfraction nach Derivatisierung mit Benzoylchlorid getrennt (vgl. Kapitel 2.4.4)

** Metabolitenmuster nicht bestimmt, da zu geringe Gesamtradioaktivität

*** Von diesen Organproben liegen keine Meßwerte vor

^3H -Fentanyl/Gehirn (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR_f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	39,	9	4	3	3
unidentifiziert	15	0	2	< 1	1	< 1
4-OH-PE-Fentanyl	35	74	4	< 1	2	< 1
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	37	4	2	2	< 1
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	15	2	4	1	< 1
α -OH-Fentanyl		5	2	1	< 1	< 1
Fentanyl		* 778	96	57	19	2,5
Gesamt- aktivität	pMol/g	926	119	68	29	7

³H-Fentanyl/Leber (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	17	29	117	72	7
unidentifiziert	15	2	10	12	12	3
4-OH-PE-Fentanyl	35	3	10	16	10	2
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	7	24	51	45	5
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	6	12	10	10	2
α-OH-Fentanyl		2	10	6	9	1
Fentanyl		233	287	322	155	14
Gesamt- aktivität	pMol/g	270	382	534	313	34

³H-Fentanyl/Mageninhalt (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	**	13	53	157	**
unidentifiziert	15		11	4	49	
4-OH-PE-Fentanyl	35		9	10	54	
4-OH-Anilino-Fentanyl	42		14	11	57	
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65		12	10	8	
α-OH-Fentanyl			12	4	5	
Fentanyl			*	155	315	
Gesamt- aktivität	pMol/g	12	226	407	681	45

³H-Fentanyl/Dünndarm (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	4	43	527	1 154	208
unidentifiziert	15	1	10	5	15	12
4-OH-PE-Fentanyl	35	1	10	25	110	57
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	1	11	17	26	12
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	2	17	7	10	3
α-OH-Fentanyl		1	10	5	15	2
Fentanyl		*	125	288	127	36
Gesamt-aktivität	pMol/g	135	389	713	1 458	330

³H-Fentanyl/Niere (pMol/Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	11	35	233	84	10
unidentifiziert	15	2	4	6	5	< 1
4-OH-PE-Fentanyl	35	1	9	11	10	2
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	1	13	30	12	2
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	< 1	33	13	8	2
α-OH-Fentanyl		1	6	6	5	1
Fentanyl		*	101	254	122	30
Gesamt-aktivität	pMol/g	118	665	553	246	47

³H-Fentanyl/Lunge (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	57	19	25	10	***
unidentifiziert	15	3	2	4	2	
4-OH-PE-Fentanyl	35	7	3	5	4	
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	16	5	15	7	
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	16	4	3	2	
α-OH-Fentanyl		5	3	8	1	
Fentanyl		828	289	198	86	
	*					
Gesamt-aktivität	pMol/g	932	325	258	112	-

³H-Fentanyl/Myocard (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	48	10	11	14	***
unidentifiziert	15	11	3	2	5	
4-OH-PE-Fentanyl	35	13	5	3	4	
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	17	5	4	6	
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	14	6	5	3	
α-OH-Fentanyl		14	2	2	2	
Fentanyl		653	162	57	30	
	*					
Gesamt-aktivität	pMol/g	770	193	84	64	-

³H-Fentanyl/Fett (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7		3	15	16	22
unidentifiziert	15		1	2	3	4
4-OH-PE-Fentanyl	35		4	2	10	3
4-OH-Anilino-Fentanyl	42		5	5	14	5
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	***	1	4	1	1
α-OH-Fentanyl			< 1	2	3	1
Fentanyl		*	36	53	85	57
Gesamtaktivität	pMol/g	—	50	83	132	93

³H-Fentanyl/Skelettmuskel (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Säuren	0-7	4	12	11	10	**
unidentifiziert	15	1	3	2	2	
4-OH-PE-Fentanyl	35	1	5	5	3	
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	1	6	4	5	
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	6	9	2	1	
α-OH-Fentanyl		2	4	1	< 1	
Fentanyl		79	91	35	29	
Gesamtaktivität	pMol/g	93	130	60	50	5

wobei in der Niere etwas mehr Säuren als OH-Verbindungen auftreten.

Die Lunge zeigt einen gegenüber dem Gehirn verzögerten Abfall der Totalaktivität, wobei der Fentanylanteil nicht unter 75 % absinkt (Tabelle 3.2.2.3.6). An Metaboliten treten Hydroxylverbindungen und Säuren im gleichen Verhältnis auf.

Myokard und Skelettmuskel zeigen schnellen Abfall der Gesamtaktivität (Tabelle 3.2.2.3.7-8). Unverändertes Fentanyl hat nach 30 Minuten noch einen Anteil von 50 % an der Gesamtaktivität.

Im Fettgewebe findet bis 90 Minuten eine stetige Anreicherung von Aktivität statt (Tabelle 3.2.2.3.9). Fentanyl ist daran zu 2/3 beteiligt. Die Hydroxylmetaboliten werden im Fettgewebe leichter gespeichert als die Säuren, da ihre Konzentration doppelt so hoch liegt wie die der Säuren.

3.2.2.4 Metabolitenmuster der Organe 5 Stunden nach intragastraler Fentanyl-Gabe

Um zu prüfen, in welchem Umfang Fentanyl nach der zu beobachtenden Sequestrierung in den Magen im Sinne der Hypothese der gastro-entero-systemischen Rezirkulation (Stoeckel 1979) wieder rückresorbiert wird, wurde 5 Stunden nach intragastraler Applikation von ^3H -Fentanyl das Metabolitenmuster einiger Organe bestimmt (Abb. 3.2.2.4). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die höchste Aktivität im Magenlumen, die zu über 85 % von unverändertem Fentanyl herrührt. Dagegen beläuft sich der Anteil der Metaboliten an der ebenfalls hohen Aktivität im Dünndarminhalt nur auf etwas mehr als 50 %. In der Niere finden sich überwiegend Säuren, aber auch Fentanyl. Vergleichsweise niedrig sind die Konzentrationen an Fentanyl und Metaboliten in den anderen Organen, deren Metabolitenmuster große Übereinstimmungen mit dem des Dünndarm erkennen läßt. Ein Vergleich der Fentanylkonzentration im

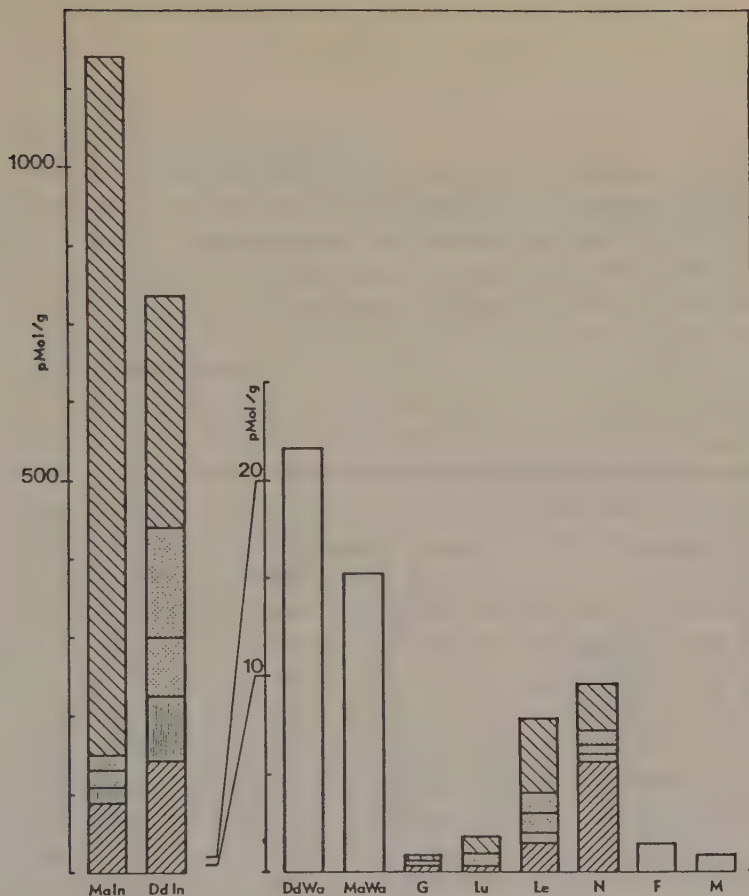


Abb. 3.2.2.4

Gesamtradioaktivität und Metabolitenmuster einiger Organe 300 Min. nach intragastraler Gabe von 6 µg/100 g (³H-Phenethyl)-Fentanyl. Die Höhe der Säulen gibt die Gesamtradioaktivität, umgerechnet in pMol/g, an. Die Höhe der gerasterten Felder entspricht den Metabolitenkonzentrationen.



Fentanylfraktion



hRf / (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl



hRf 15 (unidentifiziert)



Säuren

Die Strukturformeln der Metaboliten zeigt Abb. 4.5.

MaIn = Mageninhalt, DdIn = Dünndarminhalt, DdWa = Dünndarmwand, MaWa = Magenwand, G = Gehirn, Lu = Lunge, Le = Leber, N = Niere, F = Fett, M = Muskel

Gehirn und Vollblut zeigt, daß sich im Gehirn zwölfmal weniger Fentanyl befindet, d. h. keine Anreicherung stattgefunden hat. Das Ausmaß der Rückresorption wird durch die in Tabelle 3.2.2.4 angegebenen Prozentwerte der Dosis in den einzelnen Organen verdeutlicht.

Tabelle 3.2.2.4
Verbleib der Radioaktivität nach intragastraler Gabe

Organ	pMol/g	Organge- wicht (g) *	% der Dosis
Darminhalt	734	20	42
Mageninhalt (Vor- und Drüsenmagen)	1134	6	19,3
Darmwand	22	10	0,7
Magenwand	15	1,2	0,049
Gehirn	0,75	1,8	0,0038
Lunge	1,8	1,1	0,0057
Leber	7,7	7,6	0,166
Nieren	9,6	1,7	0,046
Fett	1,0	10	0,029
Muskel	0,72	45	0,091

* Die angegebenen eigenen biometrischen Daten stimmen gut mit denen von Hagemann (1960) überein.

3.2.2.5 Konzentrationsverlauf der Metaboliten nach i. v.-Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl

Ebenso wie bei der Darstellung der ^3H -Fentanyl-Metabolitenmuster wurden in den auf Abb. 3.2.2.5.1-5 wieder-gegebenen Diagrammen die Metaboliten zu den selben Gruppen zusammengefaßt wie in Kapitel 2.2.3. Statt der Säuregruppe, die mit (^{14}C -Anilino)-Fentanyl nicht nachweisbar ist, wurde die Gruppe "Grundkörper" eingeführt, in der Nor-Fentanyl und Anilinopiperidin zusammengefaßt sind. In den Tabellen 3.2.2.5.1-9 sind die genauen Werte aufgelistet. Der schnelle Abfall der Fentanylkonzentration im Gehirn ist auch hier deutlich zu sehen (Abb. 3.2.2.5.1). Im Gegensatz zur Säurefraktion, die das Gehirn schnell verlassen hat, reichert sich der Grundkörper im Gehirn an, liegt nach 30 Minuten in gleicher Konzentration wie Fentanyl vor und fällt danach nur langsam ab.

Bemerkenswerte Unterschiede zum ^3H -Muster weist die Metabolitenverteilung in der Leber auf (Abb. 3.2.2.5.2). Abgesehen vom zeitlich verschobenen Maximum der Gesamtaktivität, tritt neben etwas mehr Hydroxylverbindungen sehr viel Grundkörper auf. Dessen Konzentration bleibt während des Untersuchungszeitraums relativ konstant, weshalb diese Fraktion einen Anteil von 50 % der langsam abfallenden Organaktivität erreicht.

Der Konzentrationsverlauf der Metaboliten im Magenlumen ist ähnlich dem nach ^3H -Fentanyl-Gabe (Abb. 3.2.2.5.3). Lediglich der Fentanylanteil zeigt Unterschiede zum Zeitpunkt 90 Minuten p. i. Die Anreicherung des Grundkörpers erfolgt im ähnlichen Konzentrationsbereich wie die der Säure nach ^3H -Fentanyl.

Auf den ersten Blick scheint die ^{14}C -Metabolitenverteilung im Dünndarm völlig unterschiedlich vom ^3H -Metabolitenmuster (Abb. 3.2.2.5.4). Dies rührt daher, daß sich bei dem nach 270 Minuten untersuchten Tier noch sehr viel Aktivität im Dünndarm befindet. Aktivitätsmessungen der tieferen Darmabschnitte bei ^3H -Fentanyl-behandelten Rat-

Abb. 3.2.2.5.1-5

Zeitverläufe des Metabolitenmusters in Gehirn, Leber, Mageninhalt, Dünndarminhalt und Niere nach i. v.-Injektion von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl. Die Höhe der Säulen gibt die Gesamtradioaktivität (pMol/g Organ) an und die Höhe der gerasterten Felder den Anteil der Metaboliten. Die Metaboliten wurden zu folgenden Gruppen zusammengefaßt:

-  Fentanyl
-  nicht identifizierter, derivatisierbarer Metabolit
-  Hydroxylverbindungen: (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl
hR_f 42, α -Hydroxy-Fentanyl
-  Grundkörper: Nor-Fentanyl, Anilinopiperidin

Die Strukturformeln der Metaboliten zeigt Abb. 4.5.

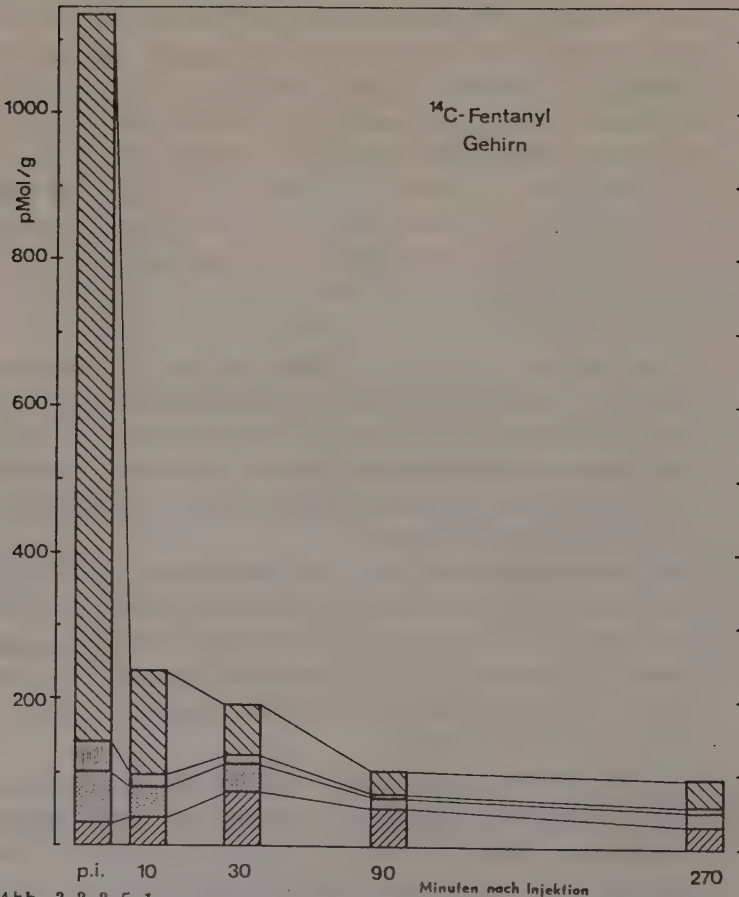


Abb. 3.2.2.5.1

Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Gehirn nach i. v.-Gabe von ^{14}C -Fentanyl

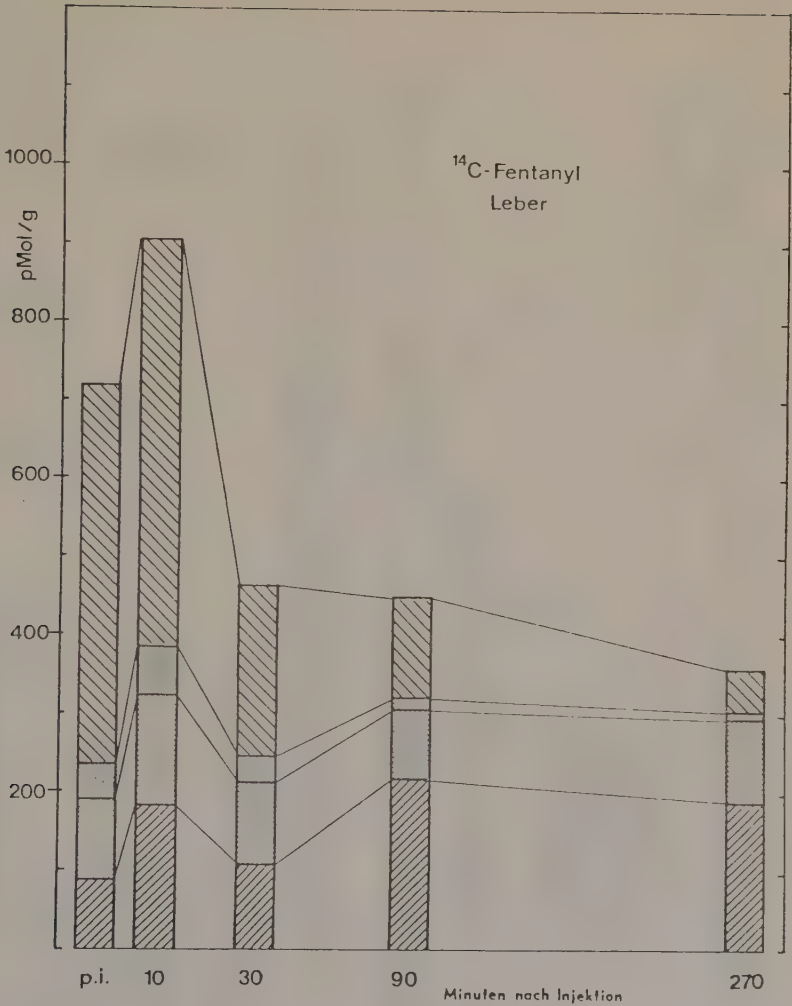


Abb. 3.2.2.5.2

Zeitverlauf des Metabolitenmusters in der Leber nach i. v.-Gabe von ¹⁴C-Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.5.1)

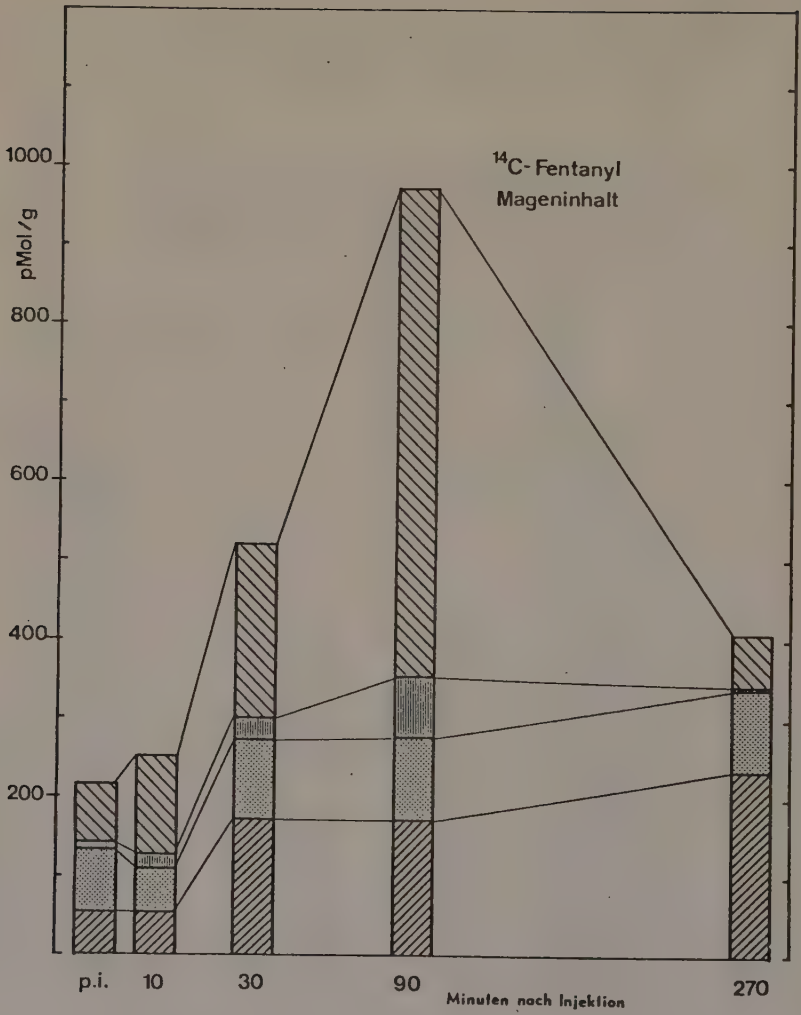


Abb. 3.2.2.5.3

Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Mageninhalt nach i. v.-Gabe von ^{14}C -Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.5.1)

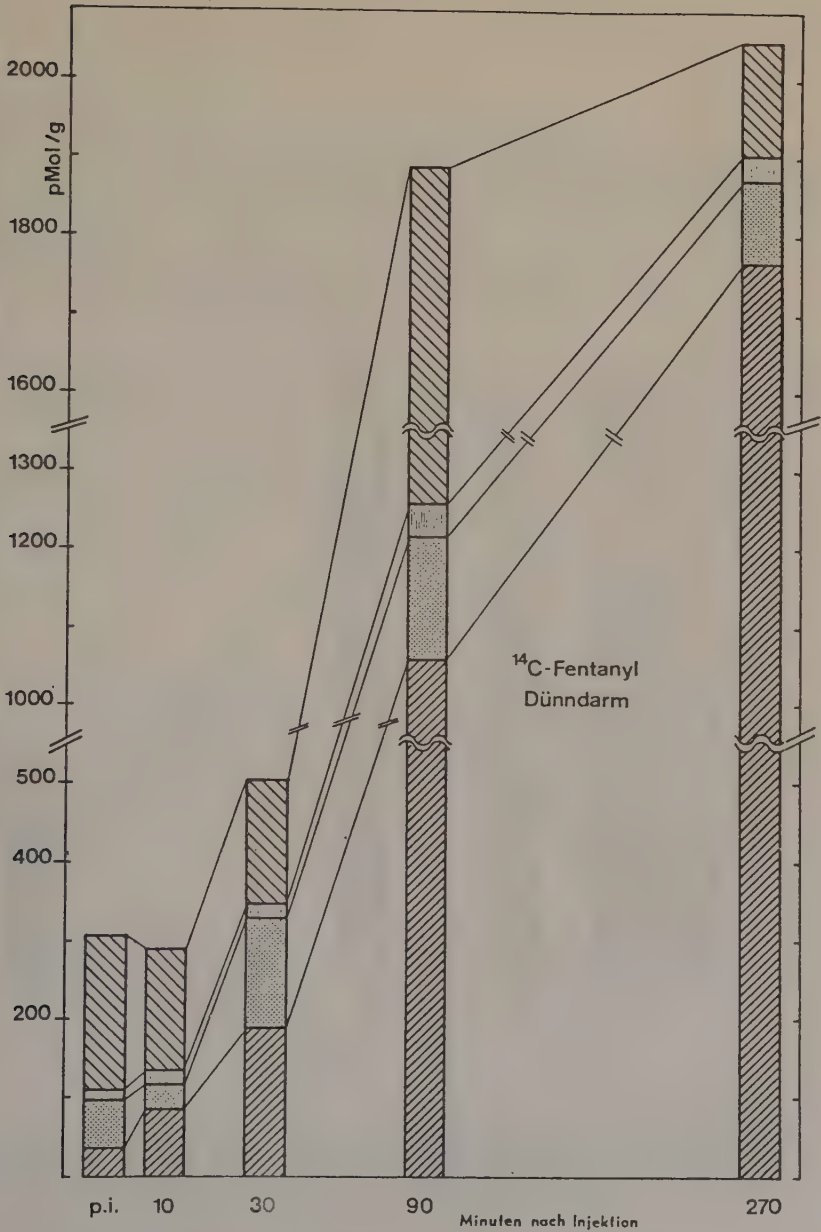


Abb. 3.2.2.5.4
Zeitverlauf des Metabolitenmusters im Dünndarm nach i. v.-Gabe
von ^{14}C -Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.5.1)

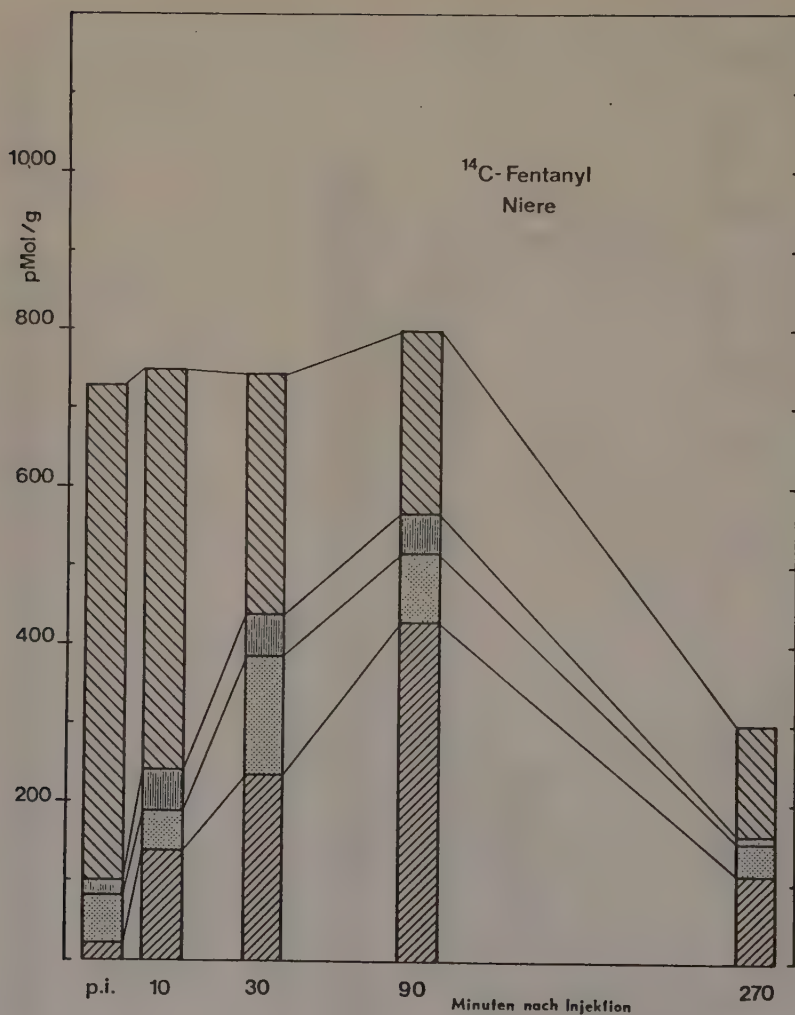


Abb. 3.2.2.5.4
Zeitverlauf des Metabolitenmusters in der Niere nach i. v.-Gabe von ¹⁴C-Fentanyl (Schraffuren wie in Abb. 3.2.2.5.1)

Tabellen 3.2.2.5.1-9

Metabolitenmuster der Rattenorgane sofort, 10, 30, 90 und 270 Min. nach Injektion von 1,82 $\mu\text{Ci}/100\text{ g}$ (^{14}C -Anilino)-Fentanyl. Angegeben ist die Gesamtradioaktivität und die Konzentration der Metaboliten in pMol/g Frischgewicht.

4-OH-PE-Fentanyl = (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl

4-OH-Anilino-Fentanyl = (4-Hydroxy-anilino)-Fentanyl

α -OH-Fentanyl = α -Hydroxy-Fentanyl

Die Strukturformeln der Metaboliten zeigt Abb. 4.5.

* Fentanylfraction nach Derivatisierung mit Benzoylchlorid getrennt (vgl. Kapitel 2.4.4)

** Metabolitenmuster nicht bestimmt, da zu geringe Gesamtradioaktivität

*** Von diesen Organproben liegen keine Meßwerte vor

^{14}C -Fentanyl/Gehirn (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR_f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	26	23	30	38	22
Nor-Fentanyl	18	6	15	42	13	7
4-OH-PE-Fentanyl	35	9	18	13	6	6
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	48	17	23	7	9
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65 *	40	16	11	5	5
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α -OH-Fentanyl		12	8	4	2	3
Fentanyl		994	141	68	33	42
Gesamt- aktivität	pMol/g	1 135	238	191	104	94

¹⁴C-Fentanyl/Leber (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	63	110	46	150	76
Nor-Fentanyl	18	23	72	61	65	90
4-OH-PE-Fentanyl	35	40	51	37	32	50
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	44	79	56	53	40
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65 * }	46	60	34	13	8
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		18	13	9	5	5
Fentanyl		484	520	219	130	91
Gesamt-aktivität	pMol/g	719	905	462	449	360

¹⁴C-Fentanyl/Mageninhalt (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	28	31	109	130	208
Nor-Fentanyl	18	25	21	62	39	25
4-OH-PE-Fentanyl	35	39	19	18	39	60
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	38	34	59	70	36
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65 * }	8	15	28	76	6
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		2	5	14	19	4
Fentanyl		75	125	230	597	69
Gesamt-aktivität	pMol/g	216	250	520	970	408

¹⁴C-Fentanyl/Dünndarm (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	18	63	114	954	1 650
Nor-Fentanyl	18	19	23	76	102	117
4-OH-PE-Fentanyl	35	22	9	60	61	62
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	33	17	88	90	41
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65	13	16	25	45	29
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		6	3	5	15	4
Fentanyl		196	155	136	623	147
Gesamt-aktivität	pMol/g	307	287	504	1 890	2 050

¹⁴C-Fentanyl/Niere (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	11	80	189	265	84
Nor-Fentanyl	18	9	58	44	162	23
4-OH-PE-Fentanyl	35	11	19	52	24	12
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	35	19	79	48	21
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65	18	47	50	53	8
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		13	10	19	15	7
Fentanyl		636	517	310	231	148
Gesamt-aktivität	pMol/g	733	750	743	798	303

¹⁴C-Fentanyl/Lunge (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	23	62	114	43	25
Nor-Fentanyl	18	11	19	44	32	34
4-OH-PE-Fentanyl	35	22	33	35	12	17
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	40	62	98	17	24
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	15	47	30	10	15
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		18	21	10	6	9
Fentanyl		1 107	536	256	87	119
Gesamt-aktivität	pMol/g	1 236	780	587	207	243

¹⁴C-Fentanyl/Myocard (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	18	10	28	23	14
Nor-Fentanyl	18	32	25	34	15	13
4-OH-PE-Fentanyl	35	46	20	15	11	9
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	97	37	40	8	9
unidentifiziert (derivatisierbar)	} 50-65	63	8	4	4	-
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		40	5	5	2	-
Fentanyl		1 374	182	86	47	40
Gesamt-aktivität	pMol/g	1 670	287	212	110	85

¹⁴C-Fentanyl/Fett (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	-	2	43	39	7
Nor-Fentanyl	18	-	2	39	23	9
4-OH-PE-Fentanyl	35	-	1	41	30	10
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	1	4	42	38	10
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65	-	1	27	31	7
Met-Fentanyl		?	?	?	?	?
α-OH-Fentanyl		-	-	10	15	7
Fentanyl		7	14	147	344	219
Gesamt-aktivität	pMol/g	8	24	349	520	269

¹⁴C-Fentanyl/Skelettmuskel (pMol/g Frischgewicht)

Verbindung	hR _f	p. i.	10 Min.	30 Min.	90 Min.	270 Min.
Anilinopiperidin	10	17	7	11	13	**
Nor-Fentanyl	18	43	6	16	17	
4-OH-PE-Fentanyl	35	17	21	24	26	
4-OH-Anilino-Fentanyl	42	34	19	29	14	
unidentifiziert (derivatisierbar)	50-65	17	16	8	1	
Met-Fentanyl		?	?	?	?	
α-OH-Fentanyl		12	6	4	4	
Fentanyl		193	114	71	84	
Gesamt-aktivität	pMol/g	333	189	163	159	10

ten haben ergeben, daß sich zu diesem Zeitpunkt die hohe Aktivität bereits in Kolon und Caecum befindet. Zum Zeitpunkt 90 Minuten p. i. ist die Konzentration an Grundkörper gleich der an ^3H -Säurefraktion. Dagegen liegt die Fentanylkonzentration 6fach höher. Die ^{14}C -Grundkörperfraktion enthält zu 90 % den als Anilinopiperidin identifizierten Metaboliten. Ein Vergleich der ^{14}C -Metabolitenkonzentration 90 Minuten und 270 Minuten p. i. ergibt eine deutliche Zunahme der Grundkörperfraktion und eine etwa gleich große Abnahme der Fentanylkonzentration. Auch das ^{14}C -Metabolitenmuster der Niere belegt eine länger anhaltende Anreicherung von unverändertem Fentanyl (Abb. 3.2.2.5.5). Der Anteil der Hydroxylverbindungen ist höher als bei den ^3H -Fentanylanalysen. Die höchste Konzentration an Grundkörper wird nach 90 Minuten erreicht, wobei das Verhältnis von Anilinopiperidin zu Nor-Fentanyl 2:1 beträgt.

In Lunge, Myokard und Skelettmuskel reichern sich nur wenige Metaboliten an (Tabelle 3.2.2.5.6-8). Der Anteil an Fentanyl sinkt nur langsam auf ca. 5 % ab.

Im Fettgewebe kommt es bis 90 Minuten zur Anreicherung von Fentanyl und - weniger ausgeprägt - von Metaboliten, wobei die Hydroxylverbindungen sich stärker anreichern als der Grundkörper (Tabelle 3.2.2.5.9).

3.3. Opiatpotenz von Fentanyl und einigen Metaboliten

Wie in der Einleitung (Kapitel 1) ausgeführt, ist nicht auszuschließen, daß aus Fentanyl Biotransformationsprodukte entstehen, die atemdepressive Wirkung zeigen. Um nun Aussagen über die opioide Wirksamkeit der Fentanylmetaboliten machen zu können, wurde am Modell des isolierten, elektrisch gereizten Meerschweinchenileums versucht, die relative Opiatpotenz von Fentanyl und seinen Metaboliten im Vergleich zu Morphin und Pethidin zu bestimmen.

In Abb. 3.3.1 ist eine exemplarische Originalregistrierung wiedergegeben, die deutlich die mit steigenden Opioiddosen zunehmende Hemmung der durch elektrische Reizung bewirkten Kontraktion der Darmstreifen zeigt.



Abb. 3.3.1

Originalregistrierung eines Versuchs zur Bestimmung der Opiatpotenz von α -Hydroxy-Fentanyl am isolierten, koaxial gereizten Meerschweinchenileum. Bei 1 wurde 62 nMol/l, bei 2 weitere 620 nMol/l und bei 3 nochmals 6,2 μ Mol/l zugegeben. N markiert die Zugabe von 20 μ Mol/l Naloxon, wodurch die opiatbedingte Hemmung der Kontraktion antagonisiert wurde.

Die Prozentualwerte der Hemmung sind in Dosis-Wirkungskurven gegen den dekadischen Logarithmus der Dosis aufgetragen (Abb. 3.3.2-3.2.4).

Morphin diente zum Kalibrieren der Methode, da für diese Substanz Vergleichswerte aus der Literatur vorlagen.

Die ID₅₀-Werte, d. h. die Konzentrationen, bei denen eine halbmaximale Hemmung eintritt, sind in Tabelle 3.3.1 zusammen mit der relativen Wirksamkeit zu Fentanyl aufgelistet.

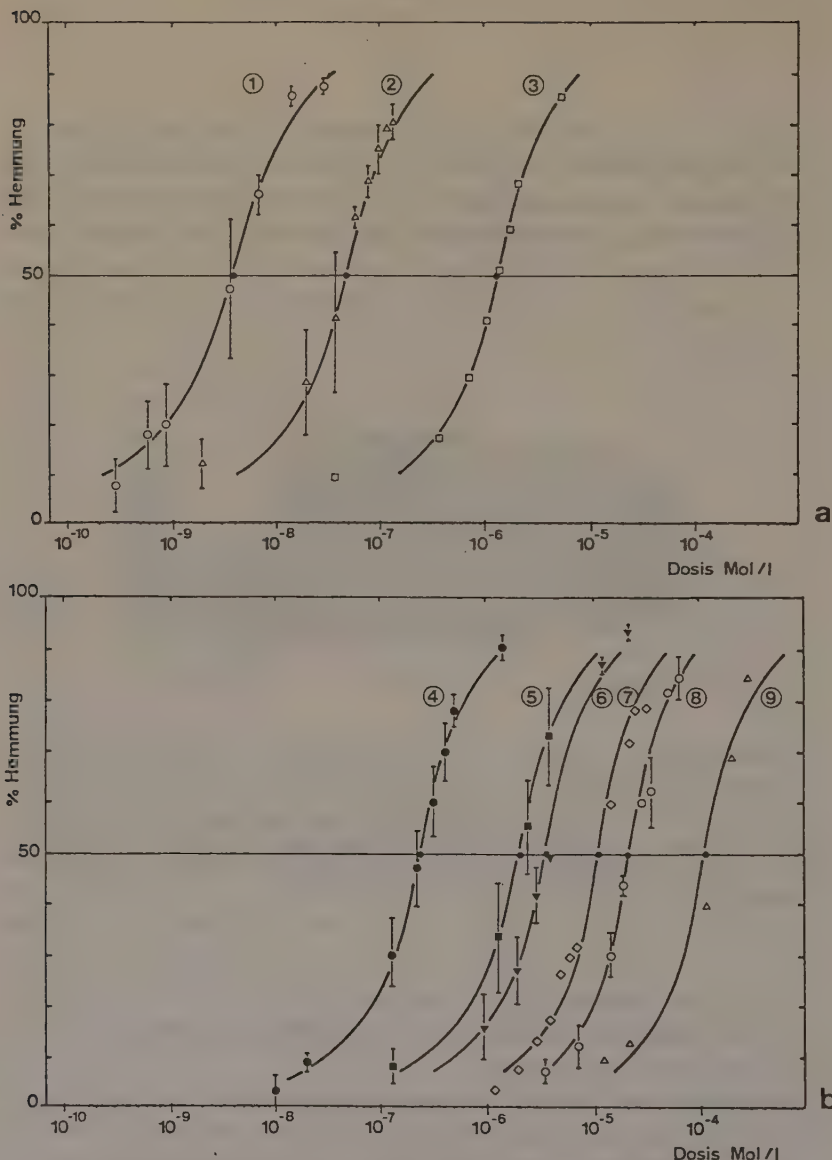


Abb. 3.3.2

Dosis-Wirkungs-Kurven von Fentanyl, Morphin und Pethidin (a) sowie von Fentanylm metaboliten (b). Aufgetragen ist die Hemmung der Kontraktion des isolierten Meerschweinchenileums gegen die molare Dosis (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

- 1 Fentanyl (n=5)
- 2 Morphin (n=4)
- 3 Pethidin (n=2)

- 4 4-Hydroxy-phenethyl-Fentanyl (n=3)
- 5 N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid (n=6)
- 6 Nor-Fentanyl (n=4)
- 7 Despropionyl-Fentanyl (n=2)
- 8 1-Methyl-4-anilinopiperidin (n=5)
- 9 4-Anilinopiperidin (n=2)

Wie die Auflistung zeigt, besitzt Morphin eine etwa 12fach geringere und Pethidin eine 320fach geringere Potenz als Fentanyl.

Tabelle 3.3.1

Opiatpotenz im isolierten Meerschweinchenileum von Fentanyl und seinen Metaboliten im Vergleich zu Morphin und Pethidin. Angegeben sind die ID₅₀-Werte und die relative Wirksamkeit zu Fentanyl.

	ID ₅₀	rel. Werte	Literaturwerte (s.Fußn.)
Fentanyl	4 nM	1	1,5 nM (2)
Morphin	50 nM	1/12	68,2 ₊₁₅ nM (1)
			69,7 ₊₅ nM(3)
4-OH-PE-Fentanyl	240 nM	1/60	
Pethidin	1,3 µM	1/325	
N-(1-Methyl-4-piperidyl-)propionanilid	2,15 µM	1/573	
Nor-Fentanyl	3,8 µM	1/950	
Despropionyl-Fentanyl	12 µM	1/3000	
N-Methyl-anilino-piperidin	22 µM	1/5500	
Anilinopiperidin	120 µM	1/30000	

(1) Kosterlitz 1968; (2) Lord 1977; (3) Portoghese 1981

Unter den Metaboliten kommt dem Hydroxylierungsprodukt 4-Hydroxy-phenethyl -Fentanyl die höchste Opiatwirksamkeit zu. Das Hauptprodukt der oxidativen N-Dealkylierung, Nor-Fentanyl, fällt dagegen stark ab, besitzt mit einer etwa 900fach geringeren Potenz als Fentanyl aber immerhin noch 1/3 der Pethidinwirkung.

Despropionyl-Fentanyl und Anilinopiperidin, die durch Amidspaltung aus Fentanyl bzw. Nor-Fentanyl entstehen können, in vivo jedoch nicht nachweisbar sind, zeigen nur mehr 1/3000 bzw. 1/30000 der Fentanylwirkung.

N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid, von dem vermutet wurde, es könnte durch Methylierung in vivo aus Nor-Fentanyl gebildet werden, weist gegenüber Nor-Fentanyl eine leichte Steigerung der Potenz auf und liegt mit etwa 1/575 der Fentanylwirksamkeit im Bereich der Pethidinwirkung. Aus diesem Grunde wurde in den Organextrakten und durch ein in vivo-Experiment versucht, die Methylierung von Nor-Fentanyl nachzuweisen (vgl. Kapitel 3.4). Sein Despropionylprodukt ist in seiner Wirkung mit dem Despropionyl-Fentanyl vergleichbar.

Das durch Eigensynthese gewonnene α -Hydroxy-Fentanyl zeigt eine von den anderen Substanzen abweichende Dosis-Wirkungs-Kurve. Wie die in Abb. 3.3.4 dargestellte Punkteschar zeigt, decken sich diese bis etwa 50 % Hemmung mit der Kurve des Morphins. Bei höheren Hemmwerten tritt eine Rechtsverschiebung der Meßpunkte ein, die sich etwa mit der Kurve deckt, wie sie mit Morphin nach Gabe von 0,2 μ M des kompetitiven Antagonisten Naloxon erhalten wird. Um sicherzustellen, daß es sich bei dem beobachteten Effekt um eine Opiatwirkung handelt, wurde bei allen untersuchten Substanzen durch Zugabe des reinen Antagonisten Naloxon am Ende des Versuchs die Reversion der Hemmung getestet.

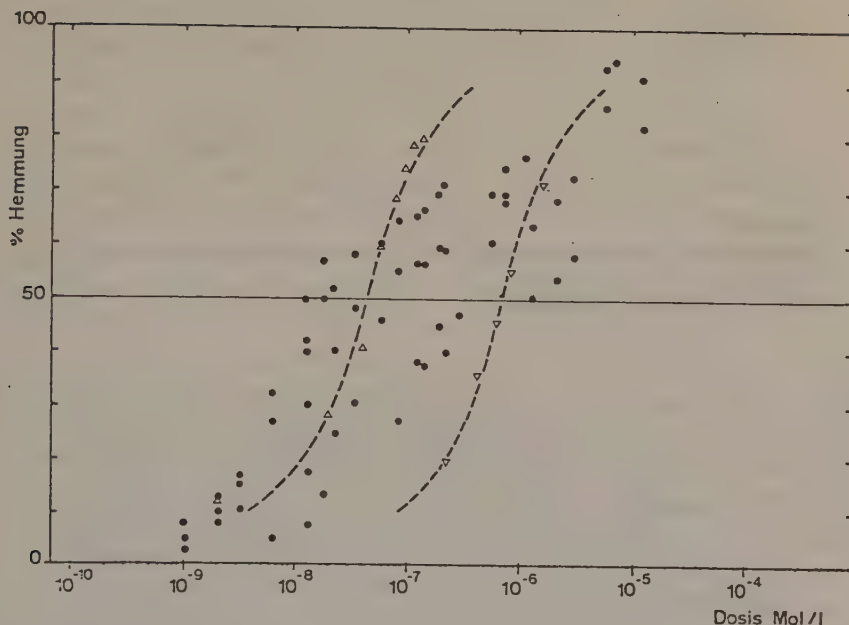


Abb. 3.3.3

Wirkung von α -Hydroxy-Fentanyl auf das elektrisch gereizte Meerschweinchenileum. Zusammenstellung der Meßwerte aus 8 Versuchen im Vergleich mit der Dosis-Wirkungs-Kurve von Morphin (Δ ----- Δ) und Morphin nach Zugabe von 0,2 μ Mol/l Naloxon (∇ ----- ∇).

3.4 Versuche zum Nachweis der Methylierung von Nor-Fentanyl in vivo

Ausgangspunkt war die Überlegung, das als Produkt der oxidativen N-Dealkylierung von Fentanyl auftretende "Nor-Fentanyl" könnte analog dem Nor-Morphin durch Methyltransferasen methyliert werden.

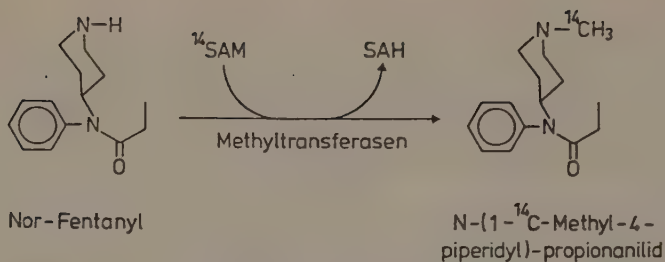


Abb. 3.4

Formelschema der enzymatischen Methylierung von Nor-Fentanyl.

SAM = S-Adenosyl-methionin

SAH = S-Adenosyl-homocystein

Mit entsprechenden Enzympräparationen aus Leber- und Gehirnhomogenaten der Ratte wurde der Versuch unternommen, radioaktiv markierte Methylgruppen durch das Coenzym SAM auf "Nor-Fentanyl" zu übertragen. Es war jedoch nicht möglich, aus diesen in vitro-Ansätzen "Methyl-Nor-Fentanyl"

= N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid zu extrahieren, das durch den radioaktiven Marker zu identifizieren gewesen wäre. Auch die radiochromatographischen Organanalysen von mit Fentanyl behandelten Ratten erbrachten keinen eindeutigen Hinweis auf das Entstehen dieses Stoffwechselprodukts in vivo.

4. Diskussion

Berichte über unerwartete postnarkotische Atemdepressionen nach Neuroleptanalgesie mit Fentanyl haben unter Anästhesisten große Beunruhigung ausgelöst (Adams 1976, Berger 1978). In der Folgezeit fehlte es nicht an Versuchen, die Ursachen dieses sog. "Fentanyl-Rebound" zu ergründen (Stoeckel 1979, Lehmann 1979, Kamp, 1982). Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei der Blutspiegelkinetik und den unter Narkosebedingungen zu beobachtenden Schwankungen geschenkt (Bovill 1980, Fung 1980, McQuay 1979, Schleimer 1978, Stoeckel 1979, McClain 1980), um Anhaltspunkte für einen möglichen Wiederanstieg der Fentanylkonzentration im Gehirn zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem Spektrum der Erklärungsmöglichkeiten zwei Fragen untersucht: Als erstes sollte geklärt werden, ob die pharmakokinetischen Eigenschaften, des Fentanyls zum Rebound durch Rückverteilung führen können. Als zweites wurde die Frage nach dem möglichen Auftreten atemdepressiv wirksamer Metaboliten behandelt. Es zeigte sich dabei, daß zwar aus der Verteilung von Fentanyl und seinen Metaboliten nicht auf einen bedeutsamen Wiederanstieg der Gehirnkonzentrationen geschlossen werden kann, es aber nicht auszuschließen ist, daß sich unter bestimmten Voraussetzungen Metaboliten mit Opiatpotenz im Gehirn anreichern können. Diese Ergebnisse werden nun im einzelnen diskutiert, wobei zunächst auf das Verteilungsverhalten eingegangen wird.

Zum Verständnis der pharmakokinetischen Eigenschaften sind zwei physikochemische Eigenschaften des Fentanyls besonders wichtig; zum einen die Lipophilie und zum anderen der Ionisationsgrad. Die Lipophilie ist entscheidend für das Ausmaß der Membranpermeabilität einer Substanz. Ausgedrückt wird dies durch den Verteilungskoeffizienten zwischen einem lipophilen (organischen) Lösungsmittel und Wasser. Für Fentanyl beträgt dieser Wert 20 im System Heptan/Wasser (pH 7.4) (Cube, 1970). Je größer der Verteilungskoeffizient, umso höher ist die Affinität zu

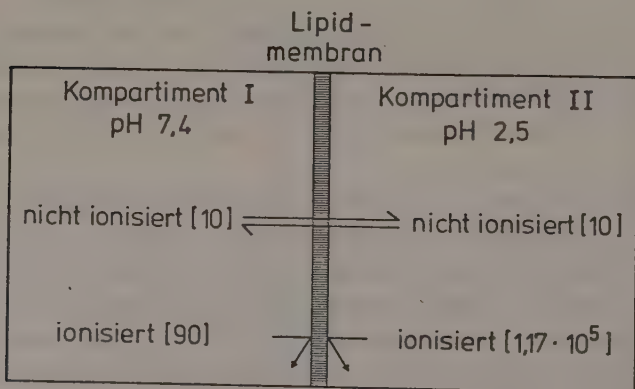
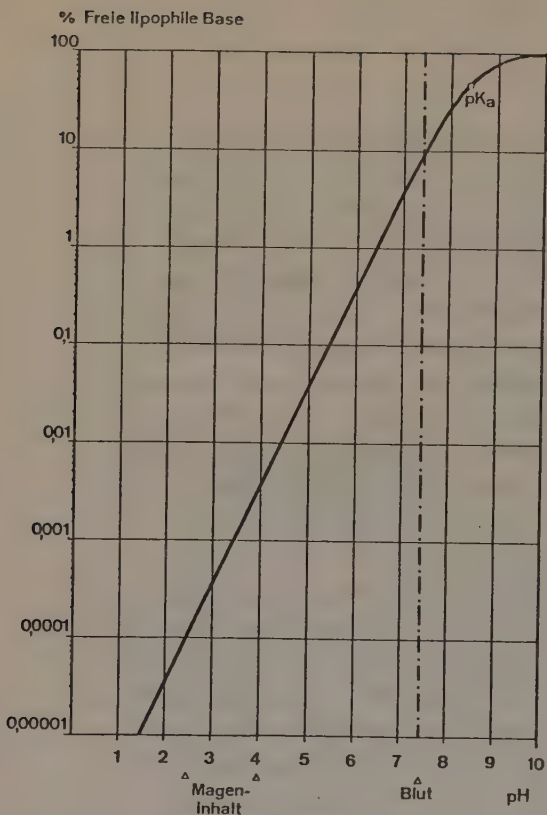


Abb. 4.2

Verteilung von Fentanyl zwischen zwei Kompartimenten mit unterschiedlichem pH-Wert und unter der Annahme, daß die beiden Kompartimente durch eine nur für die nichtionisierte Form permeable Lipidmembran getrennt sind (nichtionische Diffusion). Die Zahlen geben relative Konzentrationen an und sind aus der Ionisationskurve zu entnehmen.

Membranen, und umso leichter kann die Substanz diese durchdringen. Da aber nur ungeladene Moleküle durch Lipidmembranen diffundieren können, ist als weiterer Parameter der Ionisationsgrad entscheidend. Bei Kenntnis des pK_a -Wertes, d.h. der pH-Wert, bei dem 50 % der Substanz ionisiert vorliegt, läßt sich für jeden pH-Wert der Anteil an ungeladener Form berechnen bzw. aus Ionisationskurven (Abb. 4.1) ablesen. Der pK_a -Wert von Fentanyl beträgt 8.43 (Lauven 1981). Mit Hilfe dieses Wertes kann auch eine Voraussage über die Verteilung zwischen zwei durch Membranen getrennte Kompartimente unterschiedlichen pH-Wertes getroffen werden. In Abb. 4.2 ist als Beispiel die Anreicherung von Fentanyl in einem sauren Kompartiment dargestellt.

Daneben wird die Organverteilung auch noch von der Plasmaprotein- und der Erythrocytenbindung beeinflusst (Bower 1981, 1982). Etwa die Hälfte des im Blut befindlichen Fentanyls wird von Erythrocyten aufgenommen (Bower 1982, Meuldermans 1982), und vom restlichen Teil werden 79 % beim pH-Wert des Blutes ($pH=7,4$; $37^\circ C$) an Plasmaproteine gebunden (Bower 1981).

Lipophilie und Ionisationsgrad sind auch für den Übertritt von Fentanyl ins Gehirn von Bedeutung. Dieses für die Hauptwirkung des Fentanyls - Analgesie, Narkose, Atemdepression - besonders wichtige Kompartiment ist vom Blutraum durch spezielle Barrieren getrennt. Damit eine Substanz ins Gehirn gelangen kann, muß sie die sog. "Blut-Hirn-Schranke" bzw. die "Blut-Liquor-Schranke" überwinden. Diese Barrieren bestehen aus dem Endothel der Kapillaren und einer zusätzlich auf die Gefäße aufgelagerte Zellschicht (Bowman 1980), d. h. ein Stoffdurchtritt wird durch die Eigenschaften der Plasmamembran mitbestimmt. Dadurch ist es nur lipophilen, beim pH-Wert des Blutes ungeladenen Stoffen möglich, ins ZNS einzudringen (Bradbury 1964). Wegen seiner im Vergleich mit Morphin 5000fach höheren Lipophilie diffundiert Fentanyl schnell durch diese

Barrieren (Cube 1970). Aus der 3 Minuten dauernden Zeitdifferenz zwischen Injektion und maximaler antinoczeptiver Wirkung (Hess 1981) und dem 50 μ m betragenden Abstand der Neurone von den Kapillaren (Herz 1971) läßt sich die Geschwindigkeit der Diffusion abschätzen. Als Folge dieser raschen Diffusion ist auf den Autoradiographien der Rattenlängsschnitte nach intravenöser Injektion ein schnelles Anfluten von Radioaktivität im Gehirn zu beobachten. Dieses Verhalten ist aus Verteilungsuntersuchungen an verschiedenen Tierspezies hinlänglich bekannt (Hess 1971, 1972, Hug 1981, Appelgren 1973). Ursache ist die gute Durchblutung des Gehirns (beim Menschen 15 % des Herzminutenvolumens) sowie die hohe Plasmakonzentration an freiem Fentanyl, da kurz nach der Injektion die Bindung an Plasmaproteine noch nicht in vollem Umfang erfolgt ist. Während der Phase des Anflutens erfolgt die Anreicherung im Gehirn nicht gleichmäßig. Die graue Substanz enthält mehr Radioaktivität als die weiße, obwohl die überwiegend aus lipidreichen Axonen bestehende weiße Substanz das lipophile Fentanyl stärker binden müßte. Da die aus den Zellkörpern der Neuronen aufgebaute graue Substanz von einem dichteren Kapillarnetz durchzogen wird, kann hier mehr Fentanyl aus dem Blut ins Gewebe übertreten. Möglicherweise erfolgt die Diffusion von Fentanyl von der grauen zur weißen Substanz zu langsam, um in der kurzen Zeit bis zur Umkehr des Konzentrationsgradienten Blut/Hirn einen Ausgleich herbeizuführen. Ebenso deutlich wie das schnelle Anfluten im Gehirn ist auch die rasche Umverteilung aus dem Gehirn heraus zu erkennen. Die Fentanylkonzentration sinkt dabei parallel zum Blutspiegel ab. Ursache für den Rückgang der Blutkonzentration dürfte die Aufnahme von Fentanyl in weniger gut durchblutete Organe, wie z. B. die massenmäßig bedeutsame Muskulatur, sein (Hess 1971). Außer im ZNS findet sich kurz nach der Injektion eine größere Anreicherung von Radioaktivität in Myokard und Lunge. Im Myokard beruht

die rasche Anreicherung und der nachfolgend schnelle Abfall der Radioaktivität ebenfalls auf der guten Durchblutung. Für die Lunge scheinen zusätzlich andere Mechanismen der Anreicherung eine Rolle zu spielen, da die Anfangskonzentrationen höher liegen und die Radioaktivität langsamer absinkt als im Gehirn. Die höhere Anfangskonzentration ist durch die stärkere Durchblutung der Lunge (100 % des Herzminutenvolumens) zu erklären. Zur Erklärung des längeren Verbleibs reicht die große Oberfläche der lipidreichen Basalmembran, die kontinuierlich von den Lungenkapillaren in die Alveolarbrücken übergeht (Kessel 1979) nicht aus, obgleich sich hier das lipophile Fentanyl schnell anreichern kann, jedoch analog den Vorgängen im Gehirn ebenso schnell wieder entspeichert würde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die längerdauernde Bindung könnte eine Salzbildung des basischen Fentanyls mit sauren Mucopolysacchariden sein, obgleich Untersuchungen dazu noch fehlen.

Dem Abfall der Radioaktivität in Gehirn, Myokard und Lunge folgt eine sichtbare Anreicherung in Leber, Niere und Gastrointestinaltrakt. Sieht man in der Leber während der Verteilungsphase noch das fleckenförmige Durchblutungsmuster der Leberläppchen, so deutet die nun zu erkennende gleichförmige Markierung auf eine intrazelluläre Aufnahme zu den metabolisch aktiven Enzymsystemen hin. Etwa gleichzeitig tritt im Lumen des Duodenums eine deutliche Anreicherung von Radioaktivität auf, die zum überwiegenden Teil von Metaboliten herrührt. Da die in der Leber sichtbaren Gallengänge ähnliche Schwärzung auf dem Röntgenfilm verursachen, ist zu vermuten, daß die Metaboliten mit der Galle in den Dünndarm gelangen. Die Anreicherung der Radioaktivität in der Niere ist ein Zeichen für die intensive exkretorische Aktivität dieses Organs, bei der überwiegend hydrophile Metaboliten des Fentanyls eliminiert werden. Besonders auffällig ist auf den Autoradiographien die mit der Zeit zunehmende Anreicherung von Radio-

aktivität im Lumen des Drüsenmagens. Dieses als "ion-trapping" bezeichnete Phänomen zeigen viele basische Arzneistoffe (Schanker 1958), und es wurde auch schon für das dem Fentanyl strukturverwandte Pethidin beschrieben (Trudnowski 1979). Wie aus Abb. 4.2 zu entnehmen, liegt beim pH-Wert des Blutes der lipophile, membranpermeable Anteil an Fentanyl um mehrere Größenordnungen höher als beim pH-Wert des Magens (Magen-pH der Ratte = 2,5; Waynforth 1980). Der in den Magen diffundierende, nicht-ionische Anteil wird im sauren Kompartiment als nichtmembranpermeables Kation festgehalten. Diese Anreicherung im Magen erreicht bei der Ratte nach 90 Minuten 11 % der Dosis, was etwa dem beim Menschen beobachteten Wert entspricht (Stoeckel 1979). Eine Rückresorption dieser Menge im Darm könnte zum Wiederanstieg der Blut- und damit Gehirnspiegel führen und eine mögliche Ursache für den "Rebound" darstellen. Die Literaturangaben über den Umfang der Resorption nach oraler Fentanylgabe sind jedoch widersprüchlich. Stoeckel (1979) gibt eine Bioverfügbarkeit von 33 % an, während Lehmann et al. (1982 a) nach intragastraler ^3H -Fentanyl-Applikation am Menschen trotz einer Wiederfindung der Radioaktivität von 75 % im Harn nur Fentanyl-Plasmaspiegel findet, die um 0,2 ng/ml schwanken und damit im Bereich der Nachweisgrenze des Fentanyl-Radioimmunoassays liegen. 95 % der dabei im Harn gefundenen Radioaktivität rührte von hydrophilen Metaboliten her. Ausgehend von diesen Befunden wurde Ratten die gleiche Dosis ^3H -Fentanyl wie in den i.v.-Versuchen über eine Schlundsonde verabreicht und eine Bioverfügbarkeit für unverändertes Fentanyl von 1,5 % beobachtet. Die Blutspiegelkurve zeigt zwar am Beginn einen steilen Anstieg, der auf rasch einsetzende Resorption beim Weitertransport des Fentanyls vom Magen zum Dünndarm schließen läßt, flacht aber dann auf einem niedrigen Niveau von 0,2 ng/ml ab. Die zu jedem Zeitpunkt deutlich über den Fentanylwerten liegenden Metabolitenkonzentrationen im Blut deuten auf einen ausgeprägten "first-pass"-Metabolismus beim

Durchgang durch die Leber hin. Der hohe Anteil an Metaboliten in Dünndarm und Niere läßt auf eine ausgeprägte Resorption von Fentanyl und anschließende Sekretion der Bio-transformationsprodukte schließen.

Da sich aus den Autoradiographien nach einmaliger i.v.-Applikation von Fentanyl bei der Ratte keine Anhaltspunkte für eine Rückverteilung ins Gehirn ergeben haben und die unter der Annahme der gastro-entero-systemischen Rezirkulation beobachteten Fentanylkonzentrationen im Blut kaum ausreichen werden, eine Atemdepression auszulösen, kann das hier untersuchte pharmakokinetische Verhalten von Fentanyl das "Rebound-Phänomen" nicht erklären.

Eine zweite Möglichkeit, Ursachen für den "Fentanyl-Rebound" zu finden, besteht in der Untersuchung des Metabolismus. Dabei stellte sich vor allem die Frage, ob Bio-transformationsprodukte mit opioidder Potenz entstehen und ob diese länger im Gehirn verweilen als Fentanyl. Zur Beantwortung dieser Fragen war es zunächst nötig, das Metabolitenmuster der Organe durch radiochromatographische Methoden darzustellen und die bisher bekannten Metaboliten quantitativ zu erfassen. Bei der Ratte stellt die oxidative N-Dealkylierung der Phenethylseitenkette den Hauptabbauweg dar (Maruyama 1969, Wijngaarden 1968). Dabei entsteht Nor-Fentanyl und Phenylelessigsäure. Eine Auftrennung der aus ^3H -Phenethyl-Fentanyl gebildeten Säuren ergab, daß neben Phenylelessigsäure auch Mandelsäure und die p-Hydroxy-Produkte und evtl. auch die Dihydroxy-Verbindungen dieser Säuren entstehen. Für die Frage möglicher Intermediärmetaboliten ist es von Bedeutung, ob die Hydroxylierung vor oder erst nach Abspaltung der Seitenkette eintritt. Die Bildungsmöglichkeiten der Mandelsäure und dabei auftretende Zwischenprodukte sind in Abb. 4.3 dargestellt.

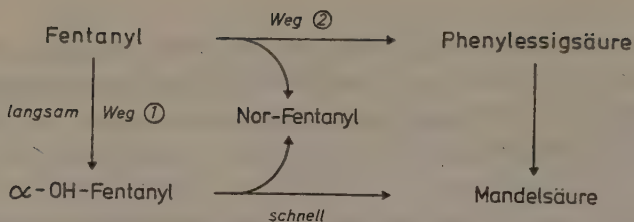


Abb. 4.3
Bildungsmöglichkeiten der Mandelsäure

Lehmann (1981) favorisiert den Weg ②, da er bei den in vitro-Versuchen mit Lebermikrosomen in geringem Umfang Mandelsäure, aber nicht α -OH-Fentanyl nachweisen konnte. Dagegen deuten die hier vorgelegten Ergebnisse aber auf den Weg ① hin, da durch Derivatisierungsreaktionen α -OH-Fentanyl in geringen Mengen nachzuweisen war und Mandelsäure in konjugierter Form in größerem Umfang auftrat. Eventuell stellt die langsame (ω -1) Oxidation zum α -OH-Fentanyl den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Theoretische Überlegungen lassen eine Destabilisierung der N-C-Bindung der Phenethylseitenkette durch die α -OH-Gruppe vermuten, was eine beschleunigte Abspaltung der Mandelsäure zur Folge hätte. Gegen den Weg ② spricht auch der Vergleich mit einer analogen Reaktionsfolge im Noradrenalinstoffwechsel (Abb. 4.4).

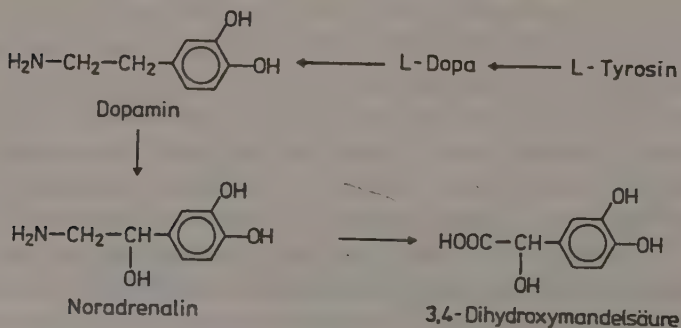


Abb. 4.4
Der Mandelsäurebildung analoge Reaktionsfolge im Stoffwechsel von Noradrenalin (nach Langer 1974).

Es ist unwahrscheinlich, daß ein polares Molekül wie die Phenylelessigsäure an einer Stelle enzymatisch oxidiert wird, die durch eine Carboxylgruppe abgeschirmt ist.

Das Intermediärprodukt zur p-Hydroxyphenylelessigsäure, 4-Hydroxy(phenethyl)-Fentanyl, läßt sich eindeutig nachweisen. Da der Anilinring aufgrund des stärker positiven Mesomerieeffekts der Aminogruppe für eine Zweitsubstitution in Parastellung besser aktiviert ist als der Phenylring der Seitenkette, sollte das 4-Hydroxy-Anilino-Fentanyl in größerer Menge auftreten als 4-Hydroxy-(phenethyl)-Fentanyl. Mit diesem 4-Hydroxy-Anilino-Fentanyl könnte die nicht identifizierte Fraktion mit dem R_f -Wert 42 identisch sein.

Über die Identität der weiteren nicht zuordenbaren Fraktionen können nur Vermutungen angestellt werden. Aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens könnte es sich bei der Fraktion R_f 15 um die Intermediärmetaboliten der Dihydroxyphenylelessigsäure oder Dihydroxymandelsäure handeln. Goromaru (1982) hat bei der Ratte die Hydroxylierung im Piperidinring des Fentanyls nachgewiesen. Ob es sich bei dem noch unbekannten derivatisierbaren Metaboliten aus der Fentanylfraktion um diese Substanz handelt, bleibt spekulativ.

Beim Pferd wurde ein sehr hydrophiler Metabolit des Fentanyls beschrieben, der durch Oxidation am terminalen C-Atom der Propionatseitenkette entsteht (Frincke, 1980). Die Eigenschaften des im Dünndarm als Hauptanteil der Säurefraktion angereicherten Metaboliten würden der Annahme nicht widersprechen, es handle sich um diese Verbindung.

Die bei den ^{14}C -Fentanyl-Versuchen als Anilinopiperidin identifizierte Fraktion könnte neben dieser, durch Amidspaltung aus Nor-Fentanyl abzuleitenden Verbindung auch noch andere Metaboliten enthalten. Despropionyl-Fentanyl, das Produkt der Amidspaltung am Fentanyl (Hug 1981),

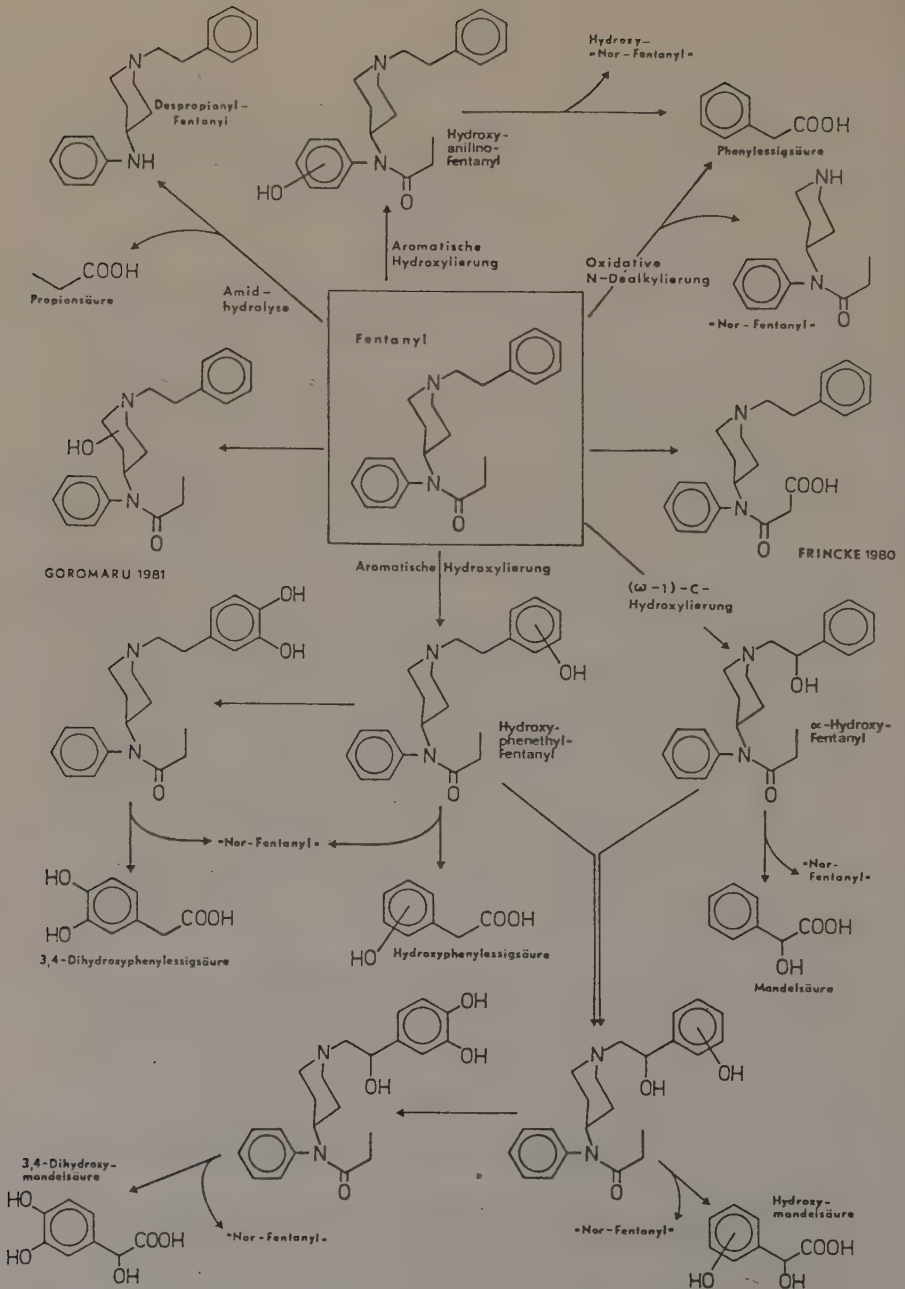


Abb. 4.5

Vermutete Biotransformationswege von Fentanyl bei der Ratte

konnte nicht nachgewiesen werden. Einen Überblick der vermuteten Biotransformationswege des Fentanyls gibt Abb. 4.5.

Nach der Darstellung des qualitativen Metabolitenmusters stellt sich die Frage nach der quantitativen Verteilung dieser Biotransformationsprodukte auf die einzelnen Organe, insbesondere Gehirn.

In der Leber, dem Hauptort der Biotransformation deutet der über längere Zeit konstante Anteil der Hydroxyfraktion auf ein Gleichgewicht zwischen metabolischem Nachschub und Zerfall dieser Intermediärprodukte hin. Da sich keine Endprodukte in der Leber anhäufen - der Nor-Fentanylgehalt bleibt konstant, der Säureanteil sinkt - werden diese wahrscheinlich rasch bilär und renal eliminiert. Die sauren Produkte der Phenethylseitenkettenspaltung werden in der Niere an Glycin gekoppelt (James 1972) und diese Konjugate mit dem Urin ausgeschieden (Heykants 1977). Mit der Galle gelangen neben Hydroxylverbindungen und Anilinopiperidin-Grundkörper der schon erwähnte sehr hydrophile Säuremetabolit in den Dünndarm. Anscheinend findet keine wesentliche Rückresorption dieser Metaboliten statt, da mit dem Faeces dreimal mehr Radioaktivität ausgeschieden wird als im Urin (Heykants 1977). Im Magen ist neben der Anreicherung an Fentanyl auch die Sequestrierung von basischen Metaboliten zu erkennen. Der Anteil der Metaboliten übersteigt nach 90 Minuten den von Fentanyl. Dieser hohe Metabolitenanteil im Magen unterstreicht die oben schon gezeigte Bedeutungslosigkeit der Rückresorption des im Magen sequestrierten Fentanyls. Für das Problem "Fentanyl-Rebound" sind die Verhältnisse im Gehirn am interessantesten. Untersuchungen mit (^3H -Phenethyl)-Fentanyl ergaben ein kurzfristiges Auftreten aller Metaboliten (Lehmann et al. 1983). Diese verlassen das Gehirn aber ebenso rasch wie Fentanyl (Hug 1981, Lehmann et al. 1983). Erst durch Verwendung von (^{14}C -Anilino)-Fentanyl war es möglich, eine Anreicherung von

Nor-Fentanyl nachzuweisen, von dem nach 30 Minuten 22 % der Radioaktivität im Gehirn herrührt. Als mögliche Ursachen dieser Anreicherung kommen neben der Umverteilung von Nor-Fentanyl aus der Leber auch eine Biotransformation im Gehirn selbst in Frage. Das Vorhandensein entsprechender Enzyme haben Untersuchungen mit Chlorpromazin ergeben. Die Enzymaktivität der mischfunktionellen Oxidase (Cytochrom P 450) im Gehirn beträgt für die Metabolisierung dieser Substanz 24 % des Leberwertes (Gorrod 1978).

Aus der Anreicherung von Metaboliten im Gehirn allein kann noch nicht auf deren Beteiligung am Rebound geschlossen werden. Zur Auslösung einer Atemdepression müssen sie opioide Potenz besitzen. Um zu zeigen, welchen Metaboliten Opiatwirkung zukommt, wurde am Modell des elektrisch gereizten Meerschweinchenileums ihre relative Potenz im Vergleich zu Fentanyl, Morphin und Pethidin bestimmt. Dieser Bioassay erlaubt es, Aussagen über die opiatrezeptorvermittelte biologische Wirkung zu machen (Paton 1957, Kosterlitz 1975). Gemessen wird die durch Opioide bewirkte Hemmung der Kontraktion des Ileums nach elektrischer Reizung des myenterischen Plexus. Als Wirkungsmechanismus vermutet man eine inhibitorische Modulation der Acetylcholinausschüttung an der neuromuskulären Endplatte (Snyder 1977). Natürliche Agonisten dieses Systems sollen in nahegelegenen Neuronen gebildete Enkephaline sein (Hughes 1981). In Abb. 4.6 sind diese Vorstellungen schematisch dargestellt. Von den verschiedenen Typen der Opiatrezeptoren sind am Meerschweinchenileum neben dem μ -Rezeptor (μ) auch noch δ - (delta) und κ -(kappa)-Rezeptoren nachgewiesen worden (Wüster, 1981). Fentanyl bindet hauptsächlich an μ -, weniger an δ - und gar nicht an κ -Rezeptoren (Schulz 1981).

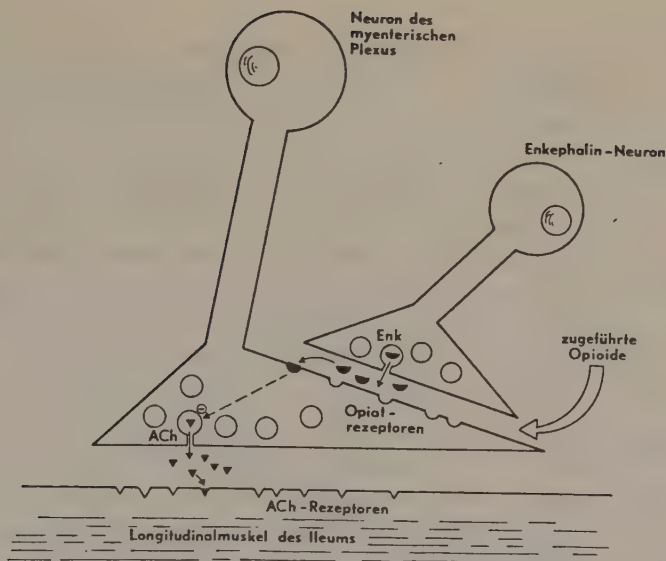


Abb. 4.6

Schematische Darstellung der Hypothese von der modulatorischen Wirkung der Enkephaline und zugeführter Opiode bei der synaptischen Erregungsübertragung am Longitudinal-Muskel des Meerschweinchen-ileums.

Enk = Enkephaline

ACh = Acetylcholin

Ein Nachteil des Bioassays ist die Toleranzentwicklung bei längerem Verweilen der Darmstücke im opioidhaltigen Organbad (Schulz 1976). Um dies zu vermeiden, wurde - im Gegensatz zu den Angaben bei Kosterlitz (1968) - sofort nach Erreichen der konzentrationsabhängigen Hemmung die nächsthöhere Dosis zugegeben. Die Wiederholbarkeit der Dosis-Wirkungs-Kurven zeigt, daß dadurch Toleranzentwicklungen weitgehend vermieden werden konnte.

Mit diesem Modell war es möglich, für einige Metaboliten des Fentanyl's Opiatpotenz nachzuweisen. Im Vergleich zur Muttersubstanz erwiesen sich die Biotransformationsprodukte als weniger wirksam. Die Hydroxyl-Verbindung (4-Hydroxy-phenethyl)-Fentanyl zeigt dem Morphin vergleichbare Wirkung, die von Nor-Fentanyl liegt nur wenig unter der des Pethidins. Der theoretisch denkbare, aber in vivo

Tabelle 4.1

Vergleich der Daten aus dem Meerschweinchenileum-Test mit Literaturdaten über Rezeptorbindung und Analgesie von Fentanyl, seinen Metaboliten sowie Morphin und Pethidin.

Substanz	Meer- schweinchen- ileum-Test ID ₅₀	Rezeptor- bindungs- Test IC ₅₀ (nM/l) (Ligand)*	"hot-plate"- Test (Maus) ED ₅₀ (mg/kg)	"tail with- drawal"-Test (Ratte) ED ₅₀ (mg/kg)
Fentanyl	4 nM	1 (DHM) [2] 3 (Fent) [11] 25 (Nalt) [6]	0,015 [1] 0,062 [12]	0,017 [4]
Morphin	50 nM	3 (DHM) [2] 6 (Nal) [8] 27 (Nalt) [11]	3,5 [9] 13,9 [12]	3,25 [4]
Pethidin	1,3 µM	700 (DHM) [11]	4,6 [1] 20,0 [3]	11 [4]
α-Hydroxy- Fentanyl	50 nM	7,6 (DHM) [12]	0,47 [12]	
4-Hydroxy- phenethyl- Fentanyl	240 nM	21,6 [7]		1,4 [5]
Nor-Fentanyl	3,8 µM			inaktiv [10]
"Methyl-Nor- Fentanyl"	2,15 µM		> 100 [1] inaktiv	
Despropionyl- Fentanyl	12 µM			inaktiv [10]
Methyl- anilino- piperidin	22 µM		7,5 [1]	
Anilino- piperidin	120 µM			

Literaturstellen: [1] Casy 1969, [2] Jacobson 1977, [3] Janssen 1960, [4] Janssen 1963, [5] Lehmann 1983, [6] Laysen 1976, [7] Lobbezoo 1980, [8] Pert 1973, [9] Portoghese 1981, [10] Soudijn 1978, [11] Stahl 1977, [12] Wenqiao 1981.

* Radioaktiver Ligand, dessen Verdrängung vom Rezeptor durch die Substanz gemessen wird.
(DHM) = Dihydromorphin, (Fent) = Fentanyl, (Nal) = Naloxon, (Nalt) = Naltrexon.
"Methyl-Nor-Fentanyl" = N-(1-Methyl-4-piperidyl)-propionanilid

nicht nachzuweisende Metabolit "Methyl-Nor-Fentanyl" ist in seiner Wirkung, wie wegen der Strukturverwandtschaft vorhergesagt, dem Pethidin gleich. Diese Verbindung hätte analog der vom Morphin bekannten reversiblen N-Demethylierung durch Methyltransferasen aus Nor-Fentanyl entstehen können (Axelrod 1962). α -Hydroxy-Fentanyl, ein nur in geringen Mengen auftretender Intermediärmetabolit, zeigt eine ungewöhnliche Dosis-Wirkungs-Kurve. Diese steigt im Konzentrations-Bereich der Morphinkurve an und springt etwa bei halbmaximaler Hemmung nach rechts, was auf einen kompetitiven Antagonismus hindeutet. Ursache könnte das synthesebedingte racemische Gemisch der Verbindung sein, wobei ein Enantiomer antagonistische Wirkung besitzt. Denkbar wäre auch eine Belegung unterschiedlicher Rezeptortypen durch die beiden Enantiomere. Neben dem hier verwendeten Modell zum Nachweis der Opiatpotenz werden Rezeptorbindungsmessungen aus Gehirnhomogenaten verwendet, die Auskunft über die Affinität eines Opioids zum Rezeptor geben (Chang 1979) oder in vivo die Schmerzreaktion im "hot plate"-Test der Maus bzw. im "tail with-drawal"-Test der Ratte (Janssen 1963) gemessen. In Tabelle 4.1 sind die Daten dieser Tests zum Vergleich mit denen des Bioassays aufgetragen.

Die Untersuchungen zum Fentanylmatabolismus haben ergeben, daß einige der bei der Ratte nachweisbaren Bio-transformationsprodukte Opiatpotenz zeigen, die dem Morphin bzw. dem Pethidin vergleichbar ist. Jedoch sind die wirksamen Verbindungen nach einmaliger Applikation von Fentanyl nur in so geringen Konzentrationen im Gehirn vorhanden, daß sich allein dadurch eine Atemdepression nicht erklären läßt.

Offen bleibt, inwieweit sich die bei der Ratte gewonnenen Erkenntnisse auf andere Spezies oder den Menschen übertragen lassen. Auch kann eine andere Applikationsweise, wie die bei der Neuroleptanalgesie häufig angewandte Nachinjektion (Kamp 1982) oder gar eine Dauerinfusion

(Hengstmann 1980), zu einer Anreicherung von wirksamen Metaboliten führen. Voraussagen über eine dadurch erhöhte Gefahr von Atemdepression sind wegen fehlender Kenntnis über die nötigen Minimalkonzentration nicht zu machen. Lehmann (1982) vermutete daß eine durch Schlaf, Pharmaka oder zentrale Deprimierung verursachte Reduktion der Vigilanz die Kompensationsmöglichkeiten des Atemzentrums einschränkt und es in diesem Zustand bereits durch geringe Opiat-Rezeptorbesetzung der Atemzentren zu einer nicht mehr kompensierbaren klinisch relevanten Atemdepression kommt.

Zur Beantwortung dieser Frage wird es nötig sein, nach vollständiger Aufklärung des Fentanylmetabolismus und Bestimmung der Opiatpotenz der dabei gefundenen Metaboliten, in Tierversuchen die bei Neuroleptanalgesie üblichen Bedingungen nachzuvollziehen.

5. Zusammenfassung

Fentanyl (N-(1-Phenethyl-4-piperidyl)-propionanilid), ein dem Pethidin strukturverwandtes synthetisches Opioid, wird wegen seiner hohen analgetischen Potenz und nur kurzen Wirkung zur Neuroleptanalgesie verwendet. Es liegen mehrere Berichte über eine unerwartete Atemdepression nach Beendigung der Narkose vor. Als mögliche Ursache wird eine Rückverteilung aus dem GI-Trakt ins Gehirn vermutet, da mehrfach ein sekundärer Anstieg der Plasmakonzentrationen beobachtet werden konnte. Welche Bedeutung die Biotransformation von Fentanyl für dieses Phänomen besitzt, ist noch unklar, obgleich Metaboliten nachgewiesen wurden, die Opiatpotenz zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Ganzkörper-Autoradiographie und radiochromatographische Methoden bei der Ratte, Anhaltspunkte für die postulierte Rückverteilung ins Gehirn oder die Bildung aktiver Metaboliten im Gehirn zu finden.

Zunächst wurde die Organverteilung von (^3H -Phenethyl)-Fentanyl sofort - 10, 30, 90 und 270 Minuten nach i. v.-Injektion - mittels Autoradiographien von Rattenlängsschnitten untersucht. Fentanyl erscheint sofort nach Injektion in Gehirn und Lunge, wird aber innerhalb weniger Minuten umverteilt und zunehmend in den exkretorisch aktiven Organen angereichert. Besonders auffällig ist die Sequestrierung in den Magen aufgrund von "ion-trapping" des basischen Wirkstoffs in diesem sauren Kompartiment. Versuche mit intragastraler Fentanylapplikation zeigten, daß der Rückresorption von in den Magen sequestriertem Fentanyl wegen des "first pass"-Metabolismus für die Erklärung der Atemdepression keine große Bedeutung zukommt. Die radiochromatographische Analyse der einzelnen Organe ergab, daß in Gehirn und Magen überwiegend Fentanyl auftritt, während in Leber, Darm und Niere sehr rasch auch Metaboliten erscheinen; in erster Linie die als Endpro-

dukte der oxidativen N-Dealkylierung der Phenethylseitenkette anzusehende Phenylelessigsäure, Mandelsäure sowie deren aromatische Hydroxylverbindungen.

Da nicht anzunehmen ist, daß diese Metaboliten zum Phänomen des "Fentanyl-Rebound" beitragen, wurde mit selbst synthetisiertem ^{14}C -Anilino-markiertem Fentanyl versucht, das Schicksal des Grundkörpers zu verfolgen.

Die Autoradiographien mit ^{14}C -markiertem Fentanyl ergaben keine grundlegenden Unterschiede in der Verteilung. Bei der radiochromatographischen Analyse fand sich der komplementäre Strukturteil der Säuren, das "Nor-Fentanyl" in allen untersuchten Organen. Besonders auffällig ist die Anreicherung dieses Metaboliten im Gehirn während der ersten 30 Minuten nach Injektion. Sowohl mit dem ^3H -markierten wie auch mit dem ^{14}C -markierten Fentanyl konnten verschiedene Hydroxylierungsprodukte des Fentanyls nachgewiesen werden, die außer in der metabolisch aktiven Leber und in den Exkretionsorganen Niere und Dünndarm auch in Gehirn und Lunge auftraten. In Leber und Dünndarm wurde ein noch nicht identifizierter Metabolit nachgewiesen, der von der Leber mit der Galle in den Dünndarm ausgeschieden wird und sich dort anreichert. Das dem Pethidin strukturverwandte Methylierungsprodukt des Nor-Fentanyls, das analog der Nor-Morphin-Methylierung entstehen könnte, war weder in vivo noch durch in vitro-Versuche nachzuweisen.

Um zu entscheiden, ob und welchen Metaboliten Opiatpotenz zukommt, wurde am Modell des isolierten, coaxial gereizten Meerschweinchenileums versucht, die Wirksamkeit der bekannten Metaboliten mit Fentanyl, Morphin und Pethidin zu vergleichen. Fentanyl erwies sich in diesem Modell als 10mal potenter als Morphin und 1000mal potenter als Pethidin. Die Hydroxylverbindungen des Fentanyls zeigen 1/100 der Fentanyl-Potenz. Nor-Fentanyl und die nicht nachzuweisende analoge Methylverbindung zeigen eine dem Pethidin vergleichbare Wirkungsstärke.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach einmaliger Gabe einer hohen Dosis von Fentanyl bei der Ratte sich keine Anhaltspunkte für einen "Rebound" ergeben haben. Nicht auszuschließen ist jedoch die Anhäufung biologisch aktiver Metaboliten in Gehirn bei mehrmaliger Injektion, wie sie bei länger dauernder Neuroleptanalgesie vorkommt. Inwieweit es dadurch zu einer atemdepressiv wirkenden Interaktion mit zur Prämedikation verwendeten Analgetika und Sedativa in der Region des Atemzentrums kommt, bleibt offen.

6. Literaturverzeichnis

- Adams A.P., Pybus D.A.:
Delayed respiratory depression after use of fentanyl
during anaesthesia.
Br.Med.J. 1, 278 (1978)
- Appelgren L.E., Terenius L.:
Differences in the autoradiographic localization of
labelled morphine-like analgesics in the mouse.
Acta Physiol.Scand. 88, 175 (1973)
- Axelrod J.:
The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs.
J.Pharmacol.exp.Ther. 117, 322 (1956)
- Axelrod J.:
Enzymatic formation of morphine in a mammal.
Life Sciences 1, 29 (1962)
- Becker C.D., Paulson B.A., Miller R.D., Severinghaus J.W.,
Eger E.I.:
Biphasic respiratory depression after fentanyl-droperidol
or fentanyl alone used to supplement nitrous oxide
anesthesia.
Anesthesiology 44, 291 (1976)
- Blattner R., Classen H.G., Dehnert H., Döring H.J.:
Experimente an isolierten glattemuskulären Organen.
Sachs, March/Freiburg 1978
- Bollman J.L.:
A cage which limits the activity of rats.
J.lab.clin.Med. 33, 1348 (1948)
- Bovill J.G., Sebel P.S.:
Pharmacokinetics of high-dose fentanyl. A study in
patients undergoing cardiac surgery.
Br.J.Anaesth. 55, 795 (1980)
- Bower S.:
Plasma protein binding of fentanyl.
J.Pharm.Pharmacol. 33, 507 (1981)

Bower S.:

The uptake of fentanyl by erythrocytes.
J.Pharm.Pharmacol. 34, 181 (1982)

Bowman W.C., Rand M.J.:

Textbook of Pharmacology, p.40.28., 2nd ed.
Blackwell, Oxford 1980

Bradbury M.W., Davson H.:

The blood-brain barrier.
in: Absorption and distribution of drugs
(T.B.Binns.edt.), p.77.
Livingstone, Edinburgh 1964

British Pharmacopoeia 1980(I), Appendix II A, Companion
Volume "Infrared Reference Spectra", Spectrum No. S95.
Her Majestys Stationery Office, London 1980

Brune K., Schneeberger J., Bättig P.:

Kontinuierlich Kreuzkulation zwischen
nichtnarkotisierten Ratten.
Z.ges.exp.Med. 155, 13 (1971)

Casy A.F., Hassan M.M.A., Simmonds A.B., Staniforth D.:

Structure-activity relations in analgesics based on
4-anilinopiperidine.
J.Pharm.Pharmacol. 21, 434 (1969)

Chang K.J., Cuatrecasas P.:

Multiple opiate receptors; morphine and enkephalines bind
to receptors of different specificity.
J.Biol.Chem. 254, 2610 (1979)

Clouet D.H.:

The methylation of normorphine in rat brain and liver.
Life Sciences 1, 31 (1962)

Cube B.v., Teschemacher H.J., Herz A., Hess R.:

Permeation morphinartiger Substanzen an den Ort der
antinociceptiven Wirkung im Gehirn in Abhängigkeit von
ihrer Lipidlöslichkeit nach intraventrikulärer und
intravenöser Applikation.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmakol. 265, 455 (1970)

Curtis C.G., Cross S.A.M., McCulloch R.J., Powell G.M.:
Whole-body autoradiography.
Academic Press, London 1981

Dudziak R.:
Neuroleptanalgesie - Standort und aktuelle Bedeutung
einer Anästhesiemethode.
perimed, Erlangen 1983

Essawi M.Y.H., Portoghese P.S.:
Synthesis and evaluation of 1- and 2- substituted
fentanyl analogues for opioid activity.
J.Med.Chem. 26, 348 (1983)

Frincke J.H., Henderson G.L.:
The major metabolite of fentanyl in the horse.
Drug Metab.Dispos. 8, 425 (1980)

Fung D.L., Eisele J.H.:
Fentanyl pharmacokinetics in awake volunteers.
J.Clin.Pharmacol. 27, 652 (1980)

Gardocky J.F., Yelnosky J.:
A study of some of the pharmacologic actions of fentanyl
citrate.
Toxicol.appl.Pharmacol. 6, 48 (1964)

Garrod J.W., Beckett A.H.:
Drug metabolism in man, p.168 .
Taylor, London 1978

Goromaru T., Furuta T., Baba S., Yoshimura N., Miyawaki
T., Sameshima T., Miyao J.:
Metabolism of fentanyl in rats and man.
Anesthesiology 55, A 173 (1981)

Goromaru T., Matsuura H., Furuta T., Baba S., Yoshimura
N., Miyawaki T., Sameshima T.:
Identification of fentanyl metabolites in rat urine by
gas chromatography-mass spectrometry with stable-isotope
tracers.
Drug Metab.Dispos. 10, 542 (1982)

Gyang E.A.,Kosterlitz H.W.:
Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on
the guinea-pig isolated ileum.
Br.J.Pharmac.Chemother. 27, 514 (1966)

Hagemann E.:
Ratte und Maus - Versuchstiere in der Forschung.
de Gruyter, Berlin 1969

Henderson G.L.,Frincke J:
Antibodies to Fentanyl.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 192, 489 (1975)

Hengstmann J.H.,Stoeckel H.,Schüttler J.:
Infusion model for fentanyl based on pharmacokinetic
analysis.
Br.J.Anaesth. 52, 1021 (1980)

Hermans B.,Janssen P.A.J.:
4-substituted piperidines.
J.Med.Chem. 9, 48 (1966)

Herz A.,Teschemacher H.J.:
Activities and sites of antinociceptive action of
morphine-like analgesics.
Advances in Drug Research 6, 79 (1971)

Hess R.,Herz A.,Friedel K.:
Pharmacokinetics of fentanyl in view of the importance
for limiting the effect.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 179, 474 (1971)

Hess R.,Stiebler G.,Herz A.:
Pharmacokinetics of fentanyl in man and in the rabbit.
Eur.J.Clin.Pharmacol. 4, 137 (1972)

Hess R.,Husmann K.,Kettler D.:
Blood levels of fentanyl during multiple injections and
intravenous infusions of low and high doses.
Meth. and Find.Exptl.Clin.Pharmacol. 3 (Suppl.1), 107 S.
(1981)

Heykants J.:
On the pharmacokinetics of fentanyl.
Interner Bericht Janssen Pharmaceutica,Beerse 1977

Hug C.C., Murphy M.R.:

Fentanyl disposition in cerebrospinal fluid and plasma and its relationship to ventilatory depression in the dog.

Anesthesiology 50, 342 (1979)

Hug C.C., Murphy M.R.:

Tissue redistribution of fentanyl and termination of its effects.

Anesthesiology 55, 369 (1981)

Hughes J.:

Peripheral opiate receptor mechanisms.

Trends in Pharmacological Sciences 2 (1), 21 (1981)

Jacobson A.E., Klee W.A., Dunn W.J.:

A quantitative relationship between antinociceptive activity, opiate receptor affinity and lipophilicity.

Eur.J.Med.Chem. 12, 49 (1977)

James M.O., Smith R.L., Williams R.T., Reidenberg M.:

Species differences in the metabolic conjugation of phenylacetic acid.

Proc.R.Soc.Lond.B. 182, 25 (1972)

Janssen Dr.C., Research Lab.:

Patent FR. M 2430 (Cl. A.61 K.C 07 d) Apr. 27, 1964

(ref. CA 62: P 14 635 a)

Janssen P.A.J., Eddy N.B.:

Compounds related to pethidine. IV. New general chemical methods of increasing the analgesic activity of pethidine.

J.Med.Pharm.Chem. 2, 31 (1960)

Janssen P.A.J.:

A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity.

Br.J.Anaesth. 34, 260 (1962)

Janssen P.A.J., Niemegeers C.J.E., Dony J.G.H.:

The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats.

Arzneimittel-Forschung 13, 502 (1963)

Janssen P.A.J., Gardocky J.F.:
US patent 3,141,823 (Cl. 167-65) July 21, 1964, Appl.
Sept. 4, 1962, 4 pp. (ref. CA 61: P 10 689 b)

Kamp H.-D.:
Opioidrebound und Antagonisierung.
in: F.W. Ahnefeld et al.: Aufwachphase, Aufwachraum,
Klinische Anästhesiologie und Intensivtherapie, Bd. 24,
Springer, Berlin-Heidelberg 1982

Kessel R.G., Kardon R.H.:
Tissues and organs - a text atlas of scanning electron
microscopy.
Freeman, San Francisco 1979

Koboyashi Y., Harris W.G.:
Preparation of whole blood for LSC.
NEN LSC Application Notes 2; NEN, Boston 1978

Kosterlitz H.W., Watt A.J.:
Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists,
with particular reference to naloxone.
Br. J. Pharmac. Chemother. 33, 266 (1968)

Kosterlitz H.W., Waterfield A.A.:
In vitro models in the study of structure-activity
relationship of narcotic drugs.
Annual Review of Pharmacology 15, 29 (1975)

Langer S.Z.:
Selective metabolic pathways for noradrenaline in the
peripheral and in the central nervous system.
Medical Biology 52, 372 (1974)

Lauven P.M., Stoeckel H., Schütter J.:
Rebound-Phänomene intravenöser Anästhetika.
Erlanger Anästhesie Seminare Nr. 6, 95 (1981)

Lehmann K.A., Daub D.:
Versuch einer Dosierungsoptimierung von Fentanyl in der
Neuroleptanalgesie.
Prakt. Anästh. 14, 293 (1979)

Lehmann K.A., Mösel G., Daub D.:
Biotransformation von Fentanyl I. In-vitro Abbau durch
Gewebe der Maus.
Anaesthesist 30, 461 (1981)

Lehmann K.A.:
Opiate - Aktuelles Wissen für Anästhesisten.
6.Refreshers-Course der Deutschen Akademie für
Anästhesiologische Weiterbildung, S.20 (1982)

Lehmann K.A., Freier J., Daub D.:
Fentanyl-Pharmakokinetik und postoperative
Atemdepression.
Anaesthesist 31, 111 (1982a)

Lehmann K.A., Weski C., Hunger L., Heinrich C., Daub D.:
Biotransformation von Fentanyl II. Akute Arzneimittel-
interaktionen - Untersuchungen bei Ratte und Mensch.
Anaesthesist 31, 221 (1982b)

Lehmann K.A.:
Individuelle biologische Variabilität nach Fentanyl -
Ursachen, Ausmaß und klinische Bedeutung.
Maschinenscript der Arbeit zum Sertürner-Preis 1983

Lehmann K.A., Hunger L., Brandt K., Daub D.:
Biotransformation von Fentanyl III. Einflüsse chronischer
Arzneimittelexposition auf Verteilung, Metabolismus und
Ausscheidung bei der Ratte.
Anaesthesist 32, 165 (1983)

Leysen J., Gommeren W., Laduron P.:
Discrimination of narcotic drugs on ³H-Fentanyl receptor
binding.
Arch.int.Pharmacodyn. 220, 335 (1976)

Lobbezoo M.W., Soudijn W., Wijngaarden I.:
Structure and receptor interactions of morphinomimetics.
Part I: Hydroxy and methoxy derivatives of fentanyl and
some morphine analogues.
Eur.J.Med.Chem. 15, 357 (1980)

Lord J.A., Waterfield A.A., Hughes J., Kosterlitz H.W.:
Endogenous opioid peptides: multiple agonists and
receptors.
Nature 267, 495 (1977)

Maruyama Y., Hosoya E.:
Studies on the fate of fentanyl.
Keio J. Med. 18, 59 (1969)

McClain D.A., Hug C.C.:
Intravenous fentanyl kinetics.
Clin. Pharmacol. Therap. 28, 106 (1980)

Meuldermans W.E.G., Hurkmans R.M.A., Heykants J.J.P.:
Plasma protein binding and distribution of fentanyl,
sufentanil, alfentanil and lofentanil in blood.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 257, 4 (1982)

Michiels M., Hendriks R., Heykants J.J.P.:
A sensitive radioimmunoassay for fentanyl plasma levels
in dogs and man.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 12, 153 (1977)

Moffat A.C.:
Evaluation of chromatographic and spectroscopic procedures. In: The poisoned patient: the role of the laboratory. Ciba Foundation Symposium 26.
Elsevier Amsterdam 1974

Organikum (K. Schwertlick, Hrsg.):
Darstellung von Benzoesäureestern durch Alkoholyse von
Benzoylchlorid. 13. Aufl., S. 446.
VEB Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974

Paton W.D.M.:
The response of the guinea-pig ileum to electrical
stimulation by coaxial electrodes.
J. Physiol., Lond. 127, 40 P (1955)

Paton W.D.M.:
The action of morphine on contraction of coaxially
stimulated guinea-pig ileum.
Brit. J. Pharmacol. 11, 119 (1957)

Patschke K.:
Ganztierautoradiographie, eine Methode in der
Arzneimittelforschung.
Münch. Med. W. 110, 2043 (1968)

Perry W.L.M.(edt.):
Pharmacological experiments on isolated preparations.
Livingstone, Edinburgh 1970

Pert C.B.,Snyder S.H.:
Opiate receptors: Demonstration in nervous tissue.
Science 179, 1011 (1973)

Portoghese P.S.,Alreja B.D.,Larson D.L.:
Allylprodine analogues as receptor probes. Evidence that
phenolic and nonphenolic ligands interact with different
subsites on identical opioid receptors.
J.Med.Chem. 25, 782 (1981)

Rügheimer E.,Heitmann D.:
Die Neuroleptanalgesie. Bilanz einer Methode.
Thieme,Stuttgart 1975

Schanker L.S.,Tocco D.J.,Brodie B.B.,Hogben C.A.N.:
Absorption of drugs from the rat small intestine.
J.Pharmacol.exp.Ther. 123, 81 (1958)

Schleimer R.,Benjamini E.,Eisele J.,Henderson G.:
Pharmacokinetics of fentanyl as determined by
radioimmunoassay.
Clin.Pharmacol.Ther. 23, 188 (1978)

Schulz R.,Herz A.:
Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of
guinea-pig.
Life Sciences 19, 1117 (1976)

Schulz R.,Wüster M.,Rubini P.,Herz A.:
Functional opiate receptors on the guinea-pig ileum.
J.Pharmacol.exp.Ther. 219, 547 (1981)

Snyder S.H.:
Opiate receptors and internal opiates.
Scientific American, p.44, March 1977

Soudijn W.:
The pharmacology and the pharmacokinetics of fentanyl.
in: Stress-free anaesthesia (C.Wood,edt.), p.3.
The Royal Society of Medicine and Academic Press,
London 1978

Stahl K.D., Bever W.van, Janssen P., Simon E.J.:
Receptor affinity and pharmacological potency of a series
of narcotic analgesics.
Eur.J.Pharmacol. 46, 199 (1977)

Stoeckel H., Hengstmann J.H., Schüttler J.:
Pharmacokinetics of fentanyl as a possible explanation
for recurrence of respiratory depression.
Br.J.Anaesth. 51, 741 (1979)

Stoeckel H., Schlüttler J., Magnussen H., Hengstmann J.H.:
Plasma fentanyl concentrations and the occurrence of
respiratory depression in volunteers.
Br.J.Anaesth. 54, 1087 (1982)

Trudnowsky R.J., Gessner T.:
Gastric excretion of intravenously administered
meperidine in surgical patients.
Anesth.Analg. 58, 88 (1979)

Ullberg S.:
The technique of whole-body autoradiography.
Science Tools, Special Issue, LKB, Bromma 1977

Yelnosky J., Gardocky J.F.:
A study of the pharmacologic actions of fentanyl citrate
and droperidol.
Toxicol.appl.Pharmacol. 6, 63 (1964)

Waynforth H.B.:
Experimental and surgical technique in the rat.
Academic Press, New York 1980

Wengiao J. et al.:
Studies on synthesis and relationship between analgesic
activity and receptor affinity for 3-methyl fentanyl
derivatives.
Scientia sinica 24, 710 (1981)

Wenzel M.:
Radiochromatographie
in: Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen
(H.Simon, Hrsg.)
Springer, Berlin 1974

Wijngaarden I. van, Soudijn W.:

The metabolism and excretion of the analgesic fentanyl (R 4263) by Wistar rats.

Life Sciences 7, 1239 (1968)

Wolff T, Hesse S.:

Species differences of mixed-function oxidase induction between rabbits and rats after pretreatment with polychlorinated biphenyls.

Biochem. Pharmacol. 26, 783 (1977)

Wüster M., Schulz R., Herz A.:

Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations.

Biochem. Pharmacol. 30, 1883 (1981)

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. K. Brune verpflichtet, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit in der Zeit von Juli 1981 bis August 1983 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt wurde. Seine großzügige Unterstützung und seine wohlwollende Betreuung trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. C.- G. Arnold danke ich für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau S. Müller und Frau K. Pustina für ihre wertvolle technische Assistenz.

Danken möchte ich für fachliche Unterstützung und Ratschläge den Kollegen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie sowie den Herren Dr. Szelenyi, Dr. Vergin und Dr. Schikaneder, Forschungsabteilung der Firma Heumann, Nürnberg.

Lebenslauf

Ernst Johann Georg S c h n e i d e r

19.4.1952 geboren in Altötting als drittes Kind des
Oberbuchhalters Franz Schneider und seiner
Frau Maria, geb.Schießl aus Töging am Inn

Mai 1952 Tod der Mutter

Sept.1958 Eintritt in die Volksschule Töging am Inn

Sept.1963 Übertritt an das Ruperti-Gymnasium Mühl-
dorf am Inn

Juli 1971 Tod des Vaters

23.6.1972 Abitur am Ruperti-Gymnasium Mühlendorf

1.7.1972 bis 30.9.1973 Ableistung des Grundwehrdienstes

WS 1973/74 Studium der Biologie/Chemie, Lehramt an
bis SS 1975 Gymnasien an der Universität Heidelberg
SS 1975 Zwischenprüfung in Chemie und Biologie
an der Universität Heidelberg

WS 1975/76 fünftes Fachsemester Biologie/Chemie
LA Gymnasien an der Universität Regens-
burg

ab SS 1975 Studium der Biologie (Diplom) an der
Universität Erlangen-Nürnberg

11.11.1978 Diplomprüfung im Fach Biologie bestanden

ab SS 1978 Studium der Pharmazie an der Universität
Erlangen-Nürnberg

August 1979 Ersten Prüfungsabschnitt Pharmazie bestanden

Mai 1980 Zweiten Prüfungsabschnitt Pharmazie bestanden

15.5. bis 15.11.1980 Pharmaziepraktikant in der Vestnertor-
Apotheke Nürnberg (Dr. G. Nothhafft)

16.8.1980 Eheschließung mit Hannelore Schöfer

15.12.1980 Pharmaziepraktikant bei der Chemischen
bis 15.6.1981 Fabrik Dr. Hetterich KG, Fürth

30.6.1981 Dritten Prüfungsabschnitt Pharmazie bestanden

seit Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Erlangen-Nürnberg, Lehrstuhl Prof.Dr.K.Brune

